

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. H. D. Cremer

Beiträge zum Oxalatstoffwechsel bei der Ratte

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Sunna Hauschildt

aus Wattenbek / Kreis Rendsburg

Gießen 1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545905_0017

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. H.D. Cremer

Beiträge zum Oxalatstoffwechsel
bei der Ratte

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Sunna Hauschildt
aus Wattenbek / Kreis Rendsburg

Gießen 1970

DEKAN:

Prof. Dr. Großmann

1. BERICHTERSTATTER:

Priv.doz. Dr. W. Feldheim

2. BERICHTERSTATTER:

Priv.doz. Dr. H. Kasper

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 2. 1970



INHALTSVERZEICHNIS

Seite:

0. Einleitung und Problemstellung	1
1. Literaturübersicht	6
1.1. Vorkommen der Oxalsäure in Nahrungsmitteln	6
1.2. Biochemie der Oxalsäure	8
1.2.1. Resorption, Ausscheidungswege und Verteilung der Oxalsäure im Organismus	8
1.2.2. Beeinflussung der Oxalatausscheidung durch verschiedene Faktoren	9
1.2.3. Oxalatbildung aus Glyoxylsäure unter Berücksichtigung anderer Glyoxalat- Stoffwechselwege	10
1.2.3.1. Glyoxalat-Abbau zu CO_2 und Formiat	10
1.2.3.2. Transaminierung von Glyoxalat	15
1.2.3.3. Reduktion zu Glykolsäure	17
1.2.3.4. Oxidation zu Oxalsäure	18
1.2.4. Oxalatbildung aus Ascorbinsäure	19
1.2.5. Oxalatbildung aus Tryptophan	20
1.2.6. Oxalatbildung und Pyridoxinmangel	22
1.3. Steinbildung und Oxalsäure	26
1.3.1. Oxalatsteinbildung beim Tier	26
1.3.2. Oxalatsteinbildung beim Menschen	27
1.3.2.1. Primäre Hyperoxalurie	28
1.3.2.2. Durch Nahrungsfaktoren verursachte Steinbildung	31
1.3.2.3. Äthylenglykolvergiftungen	34
1.3.3. Faktoren, die die Steinbildung hemmen	34

2. Material und Methoden	36
2.1. Tiermaterial	36
2.2. Tierfutter	38
2.2.1. Grundfutter	38
2.2.2. Thiamin-, Pyridoxin-, Thiamin- und Pyridoxinmangelfutter	40
2.2.3. Proteinfreies Futter	41
2.2.4. Altromin	42
2.3. Tierhaltung	42
2.4. Leberaufarbeitung	43
2.4.1. Aufarbeitung des Homogenats ohne Zugabe von Glyoxalat	43
2.4.2. Aufarbeitung des Homogenats unter Zugabe von Glyoxalat	43
2.4.3. Meßmethode und Berechnung	45
2.4.4. Proteinbestimmung	46
2.5. Oxalsäurebestimmung im Rattenurin	48
2.5.1. Titrimetrische Bestimmung der Oxalsäure	48
2.5.2. Radiochemische Bestimmung der Oxalsäure	50
2.6. Messung von markiertem ausgeatmetem CO ₂	52
1. Ergebnisse und Diskussion	54
3.1. Untersuchungen über den Glyoxylsäure- stoffwechsel	54
3.1.1. Untersuchungen des Glyoxalatumsatzes im Rattenleberhomogenat ohne Belastung und nach intraperitonealer Injektion von Glycin und Glyoxylsäure	54
3.1.2. Untersuchungen des Glyoxalatumsatzes im Rattenleberhomogenat nach vorheriger Zugabe von Glyoxalat	55

3. 2. Untersuchungen über den Abbau von markiertem Glyoxalat zu CO ₂	57
3. 3. Untersuchungen über die Oxalsäureausscheidung	61
3.3.1. Oxalsäurekonzentration im Urin bei Thiamin-, Pyridoxin- und Thiamin- und Pyridoxinmangel	61
3.3.2. Oxalsäurekonzentration bei Thiamin- mangel nach Belastung mit Äthylenglykol, Oxalsäure, Glyoxylsäure, Glycin und Tryptophan	62
3.3.3. Oxalsäurekonzentration bei Pyridoxin-, Pyridoxin- und Thiaminmangel nach Belastung mit Äthylenglykol und Glycin	65
3.3.4. Oxalsäurekonzentration im Urin bei Thiamin-, Pyridoxin- und Pyridoxin- und Thiaminmangel nach Belastung mit markierter Glyoxylsäure	67
4. Zusammenfassung	70
5. Literaturverzeichnis	73

0. Einleitung und Problemstellung

Die Oxalsäure weicht in ihrem chemischen und biochemischen Verhalten von den anderen Vertretern der homologen Reihe der organischen Dicarbonsäuren ab.

Typische Gruppeneigenschaften sind noch nicht ausgeprägt.

So verhält sich Oxalsäure bzw. Oxalat oft wie ein anorganisches Säureanion, es bildet schwerlösliche Salze und ist zu Komplexbildung befähigt.

Andererseits sind natürlich auch organische Eigenschaften der Verbindung, wie Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und Umsetzung im Stoffwechsel zu anderen organischen Verbindungen ausgebildet.

Das im Körper vorkommende Oxalat kann aus exogenen Quellen stammen oder endogen aus Vorstufen gebildet werden.

Über die endogene Oxalatsynthese ist bis jetzt noch wenig bekannt.

Die Bedeutung des mit der Nahrung zugeführten Oxalats wird häufig überschätzt - es hat sich gezeigt, daß meist nur geringe Mengen an Oxalat resorbiert werden.

Die Resorption des Oxalats wird durch andere Nahrungsbestandteile stark beeinflusst. Bei den im Darm vorliegenden Milieubedingungen ist damit zu rechnen, daß der größte Teil des Oxalats durch Bildung schwerlöslicher Verbindungen, z.B. mit Metallionen, der Resorption entgeht.

Das endogen gebildete Oxalat ist dagegen von viel größerer Bedeutung, kann doch die Bildung großer Mengen an Oxalsäure oder eine Störung des normalen Oxalatstoffwechsels zum Auf-

treten der Urolithiasis führen.

Da man nur wenig über die Zusammenhänge zwischen dem Oxalatstoffwechsel und anderen Stoffwechselwegen weiß, wird es schwierig sein, die Ursache dieser Stoffwechselstörungen zu klären. Erschwerend kommt hinzu, daß die Löslichkeitsverhältnisse für Oxalate im Urin von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden.

So beruhen wohl die Zusammenhänge zwischen Ernährung, Oxalatstoffwechsel und Urolithiasis nicht so sehr auf dem Gehalt der Nahrung an Oxalaten, sondern vielmehr auf der Beeinträchtigung des Oxalatstoffwechsels, die durch das Vorkommen oder Fehlen bestimmter Nahrungsbestandteile hervorgerufen werden kann.

Es ist also notwendig, die Vorgänge der Oxalatenentstehung im Organismus unter dem Einfluß bestimmter Kostformen zu studieren, um die Ursachen für die Urolithiasis zu erkennen. Hierzu soll in der vorliegenden Arbeit ein Beitrag geleistet werden.

Die Bildung von Oxalsäure im Organismus erfolgt mit Hilfe enzymatisch gesteuerter Reaktionen aus verschiedenen Vorstufen. Die an den Reaktionen beteiligten Enzyme enthalten z. T. entweder Thiaminpyrophosphat oder Pyridoxalphosphat als prosthetische Gruppe. Hier könnte ein Zusammenhang zwischen bestimmten Nahrungsbestandteilen und dem Oxalatstoffwechsel bestehen.

Als Substrate kommen in erster Linie Glyoxylsäure und Glycin in Betracht, so daß sich generell für Anordnungen zur Auf-

klärung der Oxalatstoffwechselvorgänge folgende Möglichkeiten ergeben:

1. Fehlen von Thiamin oder Pyridoxin im Versuchsfutter
(isoliert als auch kombiniert)
2. Erhöhung der Zufuhr an möglichen Vorstufen des Oxalats im Organismus (evtl. auch von Verbindungen, die im Stoffwechsel in diese Verbindungen übergehen können)
3. Kombination der unter 1. und 2. angeführten Möglichkeiten: Belastung mit Substrat oder Substratvorstufen bei Mangel an Vitaminen.

Bei den Untersuchungen nahm die Glyoxylsäure eine zentrale Stellung ein.

Nach Untersuchungen von Liang (31) steigt nämlich die Glyoxylsäurekonzentration in den Geweben bei mit Thiamin unterversorgten Ratten an.

Da jedoch ein fortschreitender Thiaminmangel mit einer abnehmenden Futteraufnahme, die zur Gewichtsabnahme bzw. zum Gewebsabbau führt, einhergeht, könnte die Glyoxylsäureanhäufung auch durch die verringerte Kalorienzufuhr bedingt sein und als Sekundärfolge des Thiaminmangels auftreten.

Dies war zunächst zu untersuchen, dann eine erhöhte Glyoxylsäurekonzentration kann nur dann als spezifisch für einen Thiaminmangel gelten, wenn auch nach Einschränkung der Kalorien- bzw. Proteinzufuhr bei ausreichend thiaminhaltigem Futter die Glyoxylsäurekonzentration in den Geweben und im Blut nicht ansteigt.

Die Untersuchungen von Liang (31) konnten noch in anderer Hinsicht ergänzt werden.

Die von ihm verwendete Methode für die Bestimmung der Glyoxylsäure ist die Umsetzung mit 2,4,-Dinitrophenylhydrazin. Die Methode bietet insofern Schwierigkeiten, als andere α -Ketosäuren wie Pyruvat und α -Ketoglutarat auch erfaßt werden. Eine Papierchromatische Auftrennung der Hydrazone wird notwendig, da bei Thiaminmangel die Pyruvatkonzentration ebenfalls erhöht ist. Dieses Verfahren bietet trotz hohen Zeitaufwandes nur ungenaue Ergebnisse.

Da inzwischen mit der enzymatischen Bestimmungsmethode für Glyoxalat eine Methode zur Verfügung steht, die spezifischer und weniger störanfällig ist als die soeben beschriebene Methode, wurde dieses Verfahren bei den vorliegenden Untersuchungen für die Bestimmung von Glyoxylsäure verwandt.

Zunächst wurde die Glyoxylsäurekonzentration im Leberhomogenat von Ratten bestimmt, die ein thiaminfreies Futter erhielten.

Außerdem wurde bei mit Thiamin unterversorgten Ratten nach intraperitonealer Injektion von markierter Glyoxylsäure die ausgeatmete $^{14}\text{CO}_2$ -Menge gemessen.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen läßt eine Aussage über den Einfluß des Thiamins auf den Glyoxalatabbau zu CO_2 und Formiat zu, da das Thiaminpyrophosphat wesentlicher Bestandteil bei der oxidativen Decarboxilierung der Glyoxylsäure ist

und es bei einem Thiaminmangel zu einer Blockierung der oxidativen Decarboxilierung und damit zu einer Anhäufung der Glyoxylsäure, bzw. einer verringerten $^{14}\text{CO}_2$ -Abgabe kommen müßte.

Bei erhöhter Glyoxylsäurekonzentration besteht die Möglichkeit eines vermehrten Abbaus zu Oxalsäure.

Um dieses zu prüfen, wurden Oxalsäurebestimmungen (Titrimetrie) im Urin bei Thiaminmangelratten durchgeführt und der Anteil markierter Glyoxylsäure, der in Oxalsäure übergeht, bestimmt. Bei Belastung mit verschiedenen Vorstufen des Oxalats müßte ein Anstieg der Oxalsäureausscheidung im Urin eintreten.

Unter der Annahme, daß es bei einem Pyridoxinmangel ebenfalls zu einer Glyoxalatanhäufung mit nachfolgender Oxalurie kommt, wurden mit Ausnahme der Leberhomogenatuntersuchungen dieselben Versuche wie beim Thiaminmangel durchgeführt.

Eine dritte Versuchsreihe beschäftigte sich mit der Auswirkung eines kombinierten Thiamin-Pyridoxinmangels auf die endogene Oxalatsynthese.

1. Literaturübersicht

1.1. Vorkommen der Oxalsäure in Nahrungsmitteln

Pflanzliche Nahrungsmittel weisen im Vergleich zu tierischen Produkten einen wesentlichen höheren Oxalatgehalt auf.

Hohe Oxalsäuremengen finden sich z.B. im Spinat, Rhabarber, Petersilie, Kakao und Tee.

In folgender Tabelle sind einige Werte über den Gehalt an Oxalsäure in pflanzlichen Nahrungsmitteln zusammengestellt.

Tabelle 1: Oxalsäuregehalt von Früchten, Gemüse, Getreide und Getränken (56)

<u>Früchte</u>	<u>mg/100 g Frischgew.</u>
Äpfel	1,5
Orangen	6,2
Pfirsiche	1,2
Pflaumen	3,4
Rhabarber	von 260 - 620,0
Schwarze Johannisbeere	4,3
<u>Gemüse</u>	
Bohnen (Phaseolus vulgaris, L.)	30,2
Karotten	22,7
Kartoffeln	2,3
Petersilie	166,0
Rüben	121,0
Sellerie	17,5

Spinat (<i>Spin. oleracea</i> , L.), gefroren	458,0
langstehend, rund	780,0
Tomaten	5,3

Getreide und Getreideerzeugnisse

Brot (weiß)	4,9
Früchtekuchen	11,8
Cornflakes	5,6

Getränke

Kaffeepulver	57,0
Kakaopulver (<i>Theobroma cacao</i> , L.)	623,0
Malzextraktpulver	45,9
Tee (<i>Thea sinensis</i> L.)	
gemischt, indisch, getr. Blätter	1450,0

Da die Oxalsäure schwerlösliche, schlecht resorbierbare Verbindungen mit Ca-Ionen eingeht, kann es nach Aufnahme stark oxalathaltiger Stoffe zu einer Festlegung von Ca-Ionen und somit zu einer ungenügenden Ausnutzung dieses Mineralstoffes kommen.

1.2. Biochemie der Oxalsäure

1.2.1. Resorption, Ausscheidungswege und Verteilung der Oxalsäure im Organismus

Die Resorption des Oxalats im Magen-Darmtrakt ist sehr gering. So werden von 800 bis 3200 mg oral aufgenommenen Na-Oxalats nur 2,3 - 4,5 % resorbiert (3).

Frederick (15) gibt Werte von 1 - 5 % an. Noch geringer liegt der Prozentsatz nach Aufnahme von Ca-Oxalat. (26) Ursache der schlechten Resorption sind die Unlöslichkeit von Ca-Oxalat und die Zerstörung der Oxalsäure durch die Darmbakterien. (30)

Injiziert man markiertes Oxalat, so werden nach Elder (10) innerhalb von 36 Std. 99 % der markierten Substanz im Urin wiedergefunden, nach Weinhouse (54) sind es jedoch nur 39,3 %. Dieser geringe Prozentsatz erklärt sich daraus, daß sich das übrige Oxalat in bestimmten Organen abgelagert hat (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Verteilung der Oxalsäure im Rattenkörper nach Verabfolgung von 0.001 mM markierten Oxalats (54)

<u>Organ</u>	<u>% der gesamt verabfolgten Dosis</u>
Peritoneum	0,6
Herz, Lunge, Niere, Milz, Haut	0,0
Verdauungstrakt	4,5
Knochen	13,8
Leber	0,6
Muskel	16,7
	36,2

		36,2
Urin	39,3	
Faeces	<u>3,2</u>	
	42,5	<u>42,5</u>
Gesamt		78,7

Die Tatsache, daß injiziertes Oxalat unverändert entweder im Urin ausgeschieden oder in bestimmten Organen abgelagert wird und daß kein Abbau zu CO_2 oder eine Umwandlung zu Glycin stattfindet, zeigt, daß die Oxalsäure metabolisch inert ist. (54)

Über ihr Verhalten im Säugetierorganismus ist wenig bekannt.

1.2.2. Beeinflussung der Oxalatausscheidung durch verschiedene Faktoren

Infolge Aufnahme oxalatreicher Nahrungsmittel (exogene Faktoren) kann es zu einer Erhöhung der Oxalatausscheidung im Urin kommen.

In Versuchen stellten Sengbusch und Sücker (49) fest, daß nach Aufnahme von 500 g Frischspinat (das entspricht einem Oxalatgehalt von 3,3 g) 200 mg Oxalsäure im Urin ausgeschieden wird. Das ist etwa das 5 - 10fache der normalen täglichen Ausscheidung - jedoch nur ungefähr 6 % der Zufuhr.

Nach einer Gabe von 40 g Gelatine (3 Tage lang) stieg die Oxalatausscheidung um 30 mg im Urin einer gesunden Versuchsperson an. (3) Diese erhöhte Ausscheidung könnte auf das gesteigerte Angebot von Glycin, das vermehrt in der

Gelatine enthalten ist und über die Glyoxylsäure zu Oxalsäure abgebaut wird, zurückzuführen sein.

Nicht nur exogene, sondern auch endogene Faktoren spielen bei der täglichen Oxalatausscheidung eine Rolle.

Versuche an Kaninchen zeigten, daß bei nahezu oxalatfreier Kost sich einige Tiere durch extrem hohe Oxalatwerte im Urin auszeichneten (3 Tage Harn). Die Tiere "Ausscheider" wiesen eine zehnfach höhere Oxalsäurekonzentration gegenüber den Kontrolltieren auf. (49)

1.2.3. Oxalatbildung aus Glyoxylsäure unter Berücksichtigung anderer Glyoxalatstoffwechselwege

Als direkter Vorläufer der Oxalsäure hat die Glyoxylsäure eine so wesentliche Bedeutung, daß es notwendig erscheint, ihre Stellung im Stoffwechsel näher zu charakterisieren (s. Übersicht).

1.2.3.1. Glyoxalatabbau zu CO_2 und Formiat

Die Glyoxylsäure ist die einfachste Aldehydcarbonsäure, deren Abbau zu CO_2 und Formiat über eine enzymatische, oxidative Decarboxilierung verläuft, bei der Thiamin in seiner aktiven Form, dem Thiaminpyrophosphat, als Cofaktor mitwirkt.

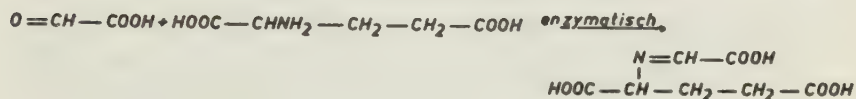
Nakada und Sund (36) konnten ein Enzymsystem (Glyoxylsäuredehydrogenase) isolieren, welches die oxidative Decarboxilierung der Glyoxylsäure katalysierte.

Das System benötigt zur Entfaltung der optimalen Aktivität NAD,

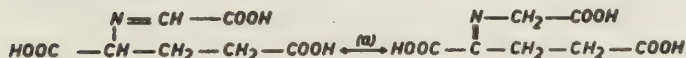
L-Glutamat, Thiaminpyrophosphat und Mn^{++} . Das Wirkungsoptimum des Enzyms liegt bei pH 6,8 - 7 und einem Glyoxalat-L-Glutamatverhältnis von 1 : 1.

Der Glyoxalatabbau läuft nach Nakada und Sund (36) wahrscheinlich in folgenden Reaktionsstufen ab:

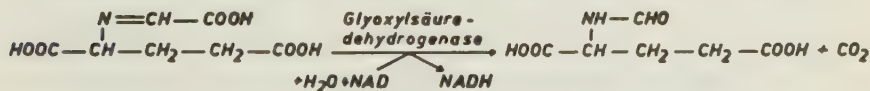
1. Aus Glyoxalat und Glutamat bildet sich auf enzymatischem Wege die hypothetische Verbindung N-Glyoxylglutaminsäure.



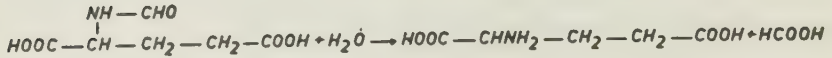
2. N-Glyoxylglutaminsäure stellt eine Schiff'sche Base dar, die in der tautomeren Form auftreten kann. (2 a)



3. Entweder die N-Glyoxylglutaminsäure selbst oder die hydrierte Form wird zu CO_2 und N-Formylglutaminsäure mit Hilfe des Enzyms, das NAD- und Thiaminabhängig ist (Glyoxylsäuredehydrogenase) umgewandelt.

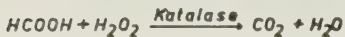


4. Die N-Formylglutaminsäure unterliegt einer enzymatischen Hydrolyse. Es entstehen Glutaminsäure und Formiat.



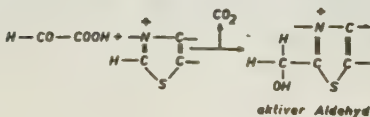
Im Gegensatz zu Nakada und Sund (36) konnten Crawlhall und Watts (9), die die Decarboxillierung in menschlichen Leber-mitochondrien untersuchten, kein N-Formylglutamat als Zwischenprodukt nachweisen; außerdem fanden sie, daß L-Keto-glutarat in stärkerem Maße als L-Glutamat die Reaktion begünstigt.

5. Die Oxidation von Formiat wird von dem Katalase-Wasserstoffperoxid-Komplex katalysiert.

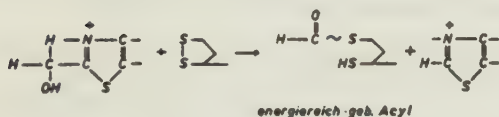


Nach neuerer Auffassung (33) nehmen außer Thiaminpyrophosphat noch Liponsäure und CoA an der oxidativen Decarboxilierung teil.

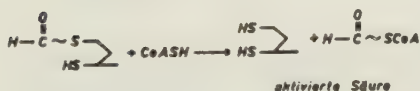
Schema der Oxidativen Decarboxilierung der Glyoxylsäure



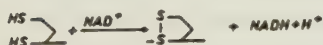
1. Von der Glyoxylsäure wird CO_2 abgespalten und ein "aktiver Aldehyd" gebildet, der an das C-Atom 2 des Thiazolrings gebunden ist.



2. Der "aktive Aldehyd" wird auf die Liponsäure übertragen. Hierbei wird der Disulfidring geöffnet, ein S-Atom lagert Wasserstoff, das andere das Acyl des Aldehyds an. Thiaminpyrophosphat bildet sich zurück. Die Bindung des Acyls an die Liponsäure ist energiereich. Sie entspricht der Bindung des Acyls an CoA.



3. Das Acyl wird auf CoA übertragen. Es entstehen Formyl-CoA und die reduzierte Form der Liponsäure.



4. Die reduzierte Form der Liponsäure wird durch ein Flavoprotein wieder dehydriert; der Wasserstoff geht auf NAD^+ über.

Die oxidative Decarboxilierung der Glyoxylsäure entspricht in ihrem Reaktionsmechanismus den im Kohlenhydratabbau erfolgenden Umwandlungen der Brenztraubensäure zu Acetyl-CoA und der α -Ketoglutarsäure zu Succinyl-CoA.

1936 konnte Peters (42) nachweisen, daß bei einem Thiaminmangel der Brenztraubensäureabbau gestört ist und es zu einer Erhöhung des Laktat- und Pyruvatgehalts im Blut kommt.

Daß durch Thiaminmangel auch eine Blockierung des Glyoxylsäureabbaus eintritt, konnte Liang (31) an mit Thiamin unterversorgten Ratten feststellen, die einen erhöhten Glyoxylsäurespiegel im Urin und Blut sowie in Gehirn, Niere, Leber, Herz und Skelettmuskel aufwiesen.

Mit zunehmendem Thiaminmangel stieg die Glyoxylsäurekonzentration an.

Während beim gesunden Menschen keine Glyoxylsäure im Blut nachweisbar ist, konnte Buckle (8) bei 2 von 10 Patienten mit Thiaminmangelercheinungen Mengen zwischen 61 und 286 $\mu\text{g}/100$ ml Blut feststellen. Wesentliche Krankheitssymptome waren bei diesen Patienten Herzfehler und Flüssigkeitsretentionen; herrschten neurologische Symptome vor, war der Befund negativ.

Welche Bedeutung die Glyoxylsäure für das Auftreten der Thiaminmangelercheinungen hat, ist noch nicht geklärt. Die Glyoxylsäure kann zusammen mit Oxalacetat Oxalomalat bilden, das eine kompetitive Wirkung auf die Aconitase

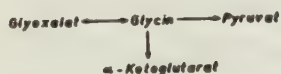
ausübt und somit die Oxidation der Zitronensäure hemmt. Dies wurde von Ruffo et al. an Rattenleber- und -nieren-mitochondrien beobachtet. (45, 46, 41)

Möglicherweise wirkt das Glyoxalat auch selbst auf das Acetat in Form einer Verdrängungshemmung, so daß die Zitratsynthese vermindert wird.

Das Glyoxalat könnte also, indem es hemmend in den Zitrat-cyclus eingreift, teilweise für eine verminderte Energieproduktion der Zellen verantwortlich sein.

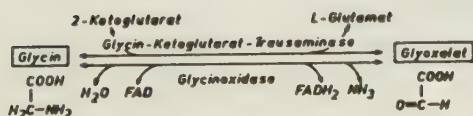
1.2.3.2. Transaminierung von Glyoxalat

Es besteht ein Stoffwechselweg zwischen Glyoxalat und Glycin, der weiterführend vom Glycin entweder über Pyruvat oder α -Ketoglutarat in den Zitronensäurecyclus einmündet. (s. Übersicht und Abb. 1).



Die Umsetzungen zwischen Glycin und Glyoxalat erfolgen entweder über

1. eine oxidative Desaminierung (44)
2. eine enzymatische Transaminierung (53) oder über
3. eine nichtenzymatische Transaminierung (14).



zu 1.

Die oxidative Desaminierung von Glycin und Glyoxalat wird von einem Enzym katalysiert (Glycinoxidase), welches Ratner als Flavoprotein identifizierte und in hohen Konzentrationen in Niere und Leber von Säugetieren nachweisen konnte. (44) Wahrscheinlich ist die Glycinoxidase mit der D-Aminosäureoxidase (1.4.3.3. D-Aminosäure: O₂ Oxidoreduktase) (28) identisch. (39)

zu 2.

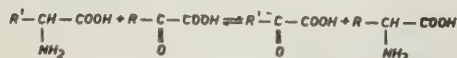
Das die Umwandlung der Glyoxylsäure zu Glycin katalysierende Enzym (Glutamat-Glycin Transaminase; 2.6.1.4. Glycin-2-Oxo-Glutarat Aminotransferase) (28) konnte von Thompson und Richardson aus der menschlichen Leber isoliert werden. (53) Die Reaktion ist unter den Reaktionsbedingungen irreversibel und benötigt als Coenzym Pyridoxalphosphat.

Glutamat und Glyoxalat → Glycin und Ketoglutarat

Die Glutamat-Glycin Transaminase katalysiert nicht die Glyoxalatsynthese aus Glycin; diese Umwandlung könnte durch die in der menschlichen Leber vorhandene Alanin-Glycin Transaminase (2.6.1.12 L-Alanin: 2-Oxosäure Aminotransferase) (28) aktiviert werden.

zu 3.

Nichtenzymatische Transaminierungen der Art:



wurden von Nakada und Weinhouse unter physiologischen Bedingungen für eine begrenzte Zahl von Fällen, bei denen $R = H$ war, beobachtet. (37)

Das Gleichgewicht dieser Reaktionen liegt vollkommen auf Seiten der Glycinbildung. Eine Transaminierung trat nicht ein, wenn R und R' Acyllderivate darstellten.

1.2.3.3. Reduktion zu Glykolsäure

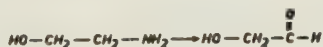
Ein weiterer Stoffwechselweg der Glyoxylsäure besteht in der Reduktion zur Hydroxysäure (Glykolsäure). Die für diesen Schritt notwendigen Enzyme sind

- a. eine $NADH_2$ -Glyoxalatreduktase (57) (1.1.1.26 - Glykolat: NAD Oxidoreduktase) (28) und
- b. eine Laktatdehydrogenase (38) (1.1.1.27 L -Laktat-NAD Oxidoreduktase) (28)

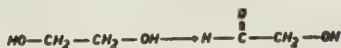
Die Glykolsäure kann aus dem Glykolaldehyd, der sich bis jetzt als einzig direkter Vorläufer der Glykolsäure erwiesen hat, gebildet werden.

Er entsteht

- a. bei der oxidativen Desaminierung von Äthanolamin und



- b. bei der Oxidation von Äthylenglykol (26)



Unter Mitwirkung der Glykolsäureoxidase (1.1.3.1.

Glykolat: O_2 Oxidoreduktase) (28) wird die Glykolsäure zu Glyoxylsäure abgebaut.

Damit mündet die Glykolsäure in den Glyoxylsäurestoffwechsel ein.

So wurden nach intravenöser Injektion von $1 \mu M$ Glykolsäure/kg beim Menschen innerhalb von 2 Std. 19,1 % als CO_2 wieder ausgeatmet und 1,03 % erschienen als Oxalat im Urin. (26)

Weinhouse (54) stellte nach intraperitonealer Injektion von Glykolsäure bei Ratten eine schnelle Umwandlung zu Glycin fest.

Griffith (25) beobachtete, daß Glykolsäure junge Ratten vor dem wachstumshemmenden Einfluß der Benzoesäure schützt; dieser Schutz geht wahrscheinlich auf die Entstehung des Glycins, das mit Benzoesäure Hippursäure bildet, zurück. Bei Versuchen an Kaninchen kam es nach Belastung mit Glykolsäure zu einer erhöhten Ausscheidung an Hippursäure. Die Glykolsäure ist zu einem Teil in Glycin umgewandelt worden.(1)

1.2.3.4. Oxidation zu Oxalsäure

Glyoxylsäure ist die einzige Substanz, von der man genau weiß, daß sie direkt in Oxalsäure übergehen kann. (15)

Die Oxidation der Glyoxylsäure zu Oxalsäure ist durch verschiedene Enzyme möglich:

1. die Xanthinoxidase (1.2.3.2. Xanthin: O_2 Oxidoreduktase)(28)

2. die Aldehyddehydrogenase (1.2.1.3. Aldehyd-NAD-Oxidoreduktase) (28)

3. die Aldehydoxidase (1.2.3.1. Aldehyd O_2 -Oxidoreduktase)(28)

4. die Glykolatoxidase (1.1.3.1. Glykolat- O_2 -Oxidoreduktase)(28,24)

Der Xanthinoxidase wird bei dieser Reaktion nicht viel Bedeutung beigemessen. (24)

1.2.4. Oxalatbildung aus Ascorbinsäure

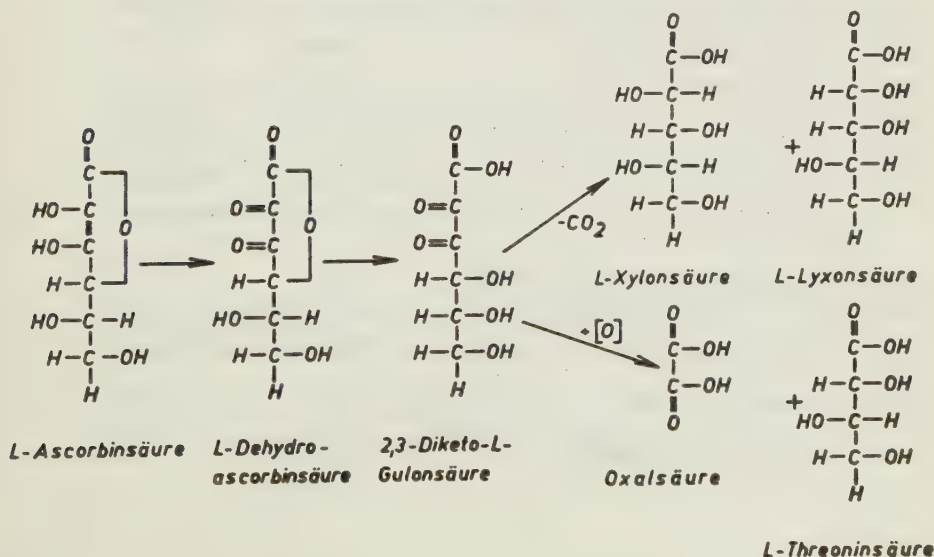
Ascorbinsäure ist neben Glycin eine Hauptquelle für die endogene Oxalsäurebildung.

Ungefähr 50 % des ausgeschiedenen Oxalats im Urin stammen beim Menschen aus Ascorbinsäure. (43)

Bei der Ratte liegt der Anteil ebenso hoch (35 - 50 %). (5)

Mit Hilfe markierter Ascorbinsäure konnte gezeigt werden, daß die Atome C_1 und C_2 der Ascorbinsäure zum Oxalataufbau verwendet werden.

Abb. 2: Mögliche Oxalatsynthese aus der Ascorbinsäure (26)



Versuche von Takenouchi (51) zeigen, daß eine hohe Belastung mit Ascorbinsäure sowohl beim Menschen als auch beim Tier nicht zu einer sonderlich erhöhten Oxalatausscheidung im Urin führt.

Kein Anstieg des Oxalats war beim Menschen nach oraler oder intravenöser Gabe von 3 g/Tag zu verzeichnen. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich nach oraler Verabreichung von 3 g für 14 Tage. Nur nach Gaben extrem hoher Mengen von 9 g für 3 Tage trat ein Anstieg ein.

Aus folgender Tabelle 3 ist ersichtlich, wie hoch bei Mensch und Tier nach Verabreichung von markierter Ascorbinsäure der Anteil der Ascorbinsäure an der entstehenden Oxalatmenge im Urin ist und wieviel % der verabfolgten Menge in Oxalsäure übergeht. (51)

<u>Tabelle 3:</u>	<u>Tier (Ratte)</u>	<u>Mensch</u>
Verabreichung an Ascorbinsäure	50 mg intraperitoneal	1,8 g oral
Anteil der verabreichten Menge, die in Oxalsäure übergeht	1,5 %	0,16 %
Entstandene Oxalatmenge im Urin	0,3-0,7 mg	3 mg
Anteil der Ascorbinsäure an der entstandenen Oxalatmenge im Urin	20- 60 %	10 %

1.2.5. Oxalatbildung aus Tryptophan

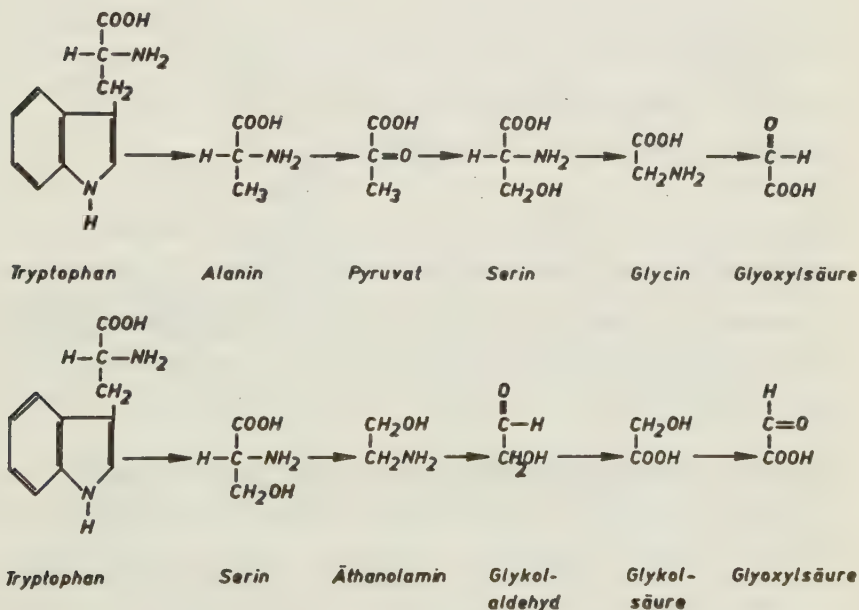
DL-Tryptophan kommt ebenso als mögliche Quelle der Oxalsäurebildung in Frage. Verschiedene Autoren stellten beim Menschen einen Anstieg der Oxalatausscheidung nach

Tryptophanbelastung fest. (21; 11)

Faragalla und Gershoff (12) beobachteten an Ratten, daß bei einer Markierung des Tryptophans am C-2 Atom 16 mal mehr ^{14}C im Oxalat wiedergefunden wurde, als wenn die Markierung beim C-3 Atom lag.

Eine endgültige Deutung der Beobachtung liegt noch nicht vor, man nimmt nur an, daß die Bildung des Oxalats von der Seitenkette des Tryptophans her erfolgt und zwar entweder über Alanin, Pyruvat, Serin, Glycin und Glyoxylsäure oder über Serin (Decarboxilierung) Äthanolamin, Glykolaldehyd, Glykolsäure, Glyoxylsäure, Oxalsäure.

Abb. 3:



1.2.6. Oxalatbildung und Pyridoxinmangel

Bei Ratten, Katzen, Cebus- und Rhesusaffen konnte Gershoff eine Oxalurie feststellen, die durch einen Pyridoxinmangel hervorgerufen wurde.

Pyridoxalphosphat wird als Cofaktor bei der enzymatischen Transaminierung von Glyoxylsäure zu Glycin benötigt.

Im Falle eines Pyridoxinmangels kann der Abbauweg der Glyoxylsäure zu Glycin blockiert sein.

Wie Runyan und Gershoff an Versuchen mit Ratten zeigen konnten, ist die Glycinsynthese aus Glyoxyl- und Glykolsäure vermindert. (47)

Änderungen im Glycinstoffwechsel machten sich ebenso bemerkbar in einem vermehrten Glycingehalt im Gewebe und einer verringerten Oxidation von Glycin zu CO_2 im Leber- und Nierenhomogenat. (47, 48, 50)

Welche Zusammenhänge zwischen diesen Befunden und der Oxalurie bestehen, ist noch ungewiß.

Eine Änderung der Oxalatausscheidung bei Pyridoxinfrei ernährten Tieren kann durch Gaben von Glycin, Pyridoxinantagonisten (Isonicotinsäurehydrazid und Desoxypyridoxin) Sulfat, Phosphat, Thiamin, und Riboflavin herbeigeführt werden. (16)

Tabelle 4 zeigt einige Ergebnisse aus dieser Versuchsreihe.

Tabelle 4: Der Einfluß verschiedener Nahrungsfaktoren auf die Oxalurie bei mit Pyridoxin unterversorgten Ratten

Kostform	Oxalsäure (mg/48hr/100 g) Körpergewicht)	Autoren
+ B ₆	1,1	Gershoff u.
- B ₆	2,3	Faragalla
- B ₆ + 3 % Glycin	3,2	(1959)
- B ₆ ^a	1,5	
- B ₆ + desoxypyridoxin	3,1	"
- B ₆ + desoxypyridoxin + 3 % Glycin	5,2	
- B ₆	1,4	"
- B ₆ + Isonicotinsäure- hydrazid	2,8	
- B ₆ + 2 % Glycin	2,7	
- B ₆ , - B ₁ , + 2 % Glycin	1,7	"
- B ₆ , - B ₂ , + 2 % Glycin	1,3	(1964)
- B ₆ + 3 % Glycin, 145 mg S, + 398 mg P pro 100 g Futter	3,8	
- B ₆ + 3 % Glycin, 89 mg S, und 398 mg P pro 100 g Futter	2,3	"
- B ₆ + 3 % Glycin, 145 mg S und 200 mg P pro 100 g Futter	0,7	(1963)

a. Diese Kostform enthielt 40 % Casein; alle anderen 15 %.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Oxalatausscheidung im Urin bei Pyridoxinmangel erhöht ist und daß das Desoxypyridoxin diesen Effekt verstärkt. Am stärksten tritt die Oxalurie nach Verabreichung einer 40 %igen Caseinhaltigen

Kost, die mit 3 %iger Glycinlösung und Desoxypyridoxin angereichert ist, in Erscheinung. (19)

Isonicotinsäurehydrazid (INH) ebenso ein Pyridoxinantagonist, das bei der Behandlung von Tuberkulose angewandt wird, läßt den Pyridoxinbedarf ansteigen. Seine Wirkung auf die Oxalatsynthese wurde bei Ratten, die eine 15 %ige Caseinhaltige Kost ohne Zugaben von Glycin erhielten, untersucht. Im 48 Std.-Urin wurde der Oxalatgehalt bestimmt. Tabelle 5 zeigt die Durchschnittswerte dieser Versuche, aus denen deutlich zu erkennen ist, daß INH die Oxalatausscheidung im Urin erhöht und dies besonders, wenn die Tiere mit Pyridoxin unterversorgt sind. (19)

Tabelle 5: Der Einfluß von INH auf die Oxalurie bei Ratten

Versuchsanordnung	mg im Urin ausgeschiedene Oxal- säure pro 100 g Körpergewicht pro 48 Std.	+
+ B ₆	0,7 ± 0,2	
+ B ₆ + INH	1,1 ± 0,2	
- B ₆	1,4 ± 0,2	
- B ₆ + INH	2,8 ± 0,3	

+) jede Zahl gibt den Durchschnittswert von 6 Untersuchungen plus die Standardabweichung des Durchschnittwertes an. (19)

Ein Pyridoxinmangel macht sich ebenso in einer Änderung des Glykolsäure- und Äthylenglykolstoffwechsels bemerkbar. (s. Tabelle 6)

Pyridoxinfrei ernährte Ratten schieden nach Injektion von diesen Verbindungen (markiert) 10 - 18 mal mehr markierte

Oxalsäure im Urin aus, als die Kontrolltiere. Nur geringe Unterschiede ergaben sich in der Oxalatausscheidung zwischen Mangel- und Kontrolltieren, wenn Glyoxyl-1-¹⁴C säure, Glycin -1-¹⁴C und Serin -1-¹⁴C gespritzt wurde. (16)

Tabelle 6: Der Einfluß eines Pyridoxinmangels auf die Umwandlung verschiedener Metaboliten in Oxalsäure. a.b.

Metabolit	B ₆	% des injizierten ¹⁴ C ausgeschieden als Oxalsäure
Glykol-1- ¹⁴ C säure	+	1
	-	18
Äthylen-1,2- ¹⁴ C glykol	+	0,25
	-	2,5
Glyoxyl-1- ¹⁴ C säure	+	11,5
	-	10,0
Glycin-1- ¹⁴ C	+	0,2
	-	0,2
Serin-3- ¹⁴ C	+	0,005
	-	0,008

a. von Runyan und Gershoff (1964)

b. den Ratten wurde 1 µC des Metaboliten/100 g Körpergewicht injiziert, nachdem sie die Versuchskost 2 Wochen erhalten haben. (16)

Der Abbau der Glykolsäure scheint im B₆-mangel gestört zu sein, was sich in einer verminderten Glycinsynthese und einer erhöhten Ausscheidung von Glykolsäure im Urin bemerkbar macht.

Bei Kontrolltieren war die spez. Aktivität der Hippursäure nach einer Injektion von markiertem Glykolat größer als

nach einer Injektion von markiertem Glyoxalat. Wahrscheinlich ist der Teil der Glyoxylsäure, der in Glycin übergeht und für die Hippursäuresynthese zur Verfügung steht, wegen der hohen Reaktionsfähigkeit der Glyoxylsäure nur gering.

Wird Pyridoxinmangeltieren markierte Glyoxylsäure bzw. Glykolsäure injiziert, so ist die spez. Aktivität der Hippursäure gegenüber Kontrollen im gleichen Maß vermindert, die spez. Aktivität der Oxalsäure im Falle des Glykolats jedoch gesteigert, während die Glyoxylsäure keinen Einfluß auf die spez. Aktivität der Oxalsäure hat.

Wahrscheinlich wird die Glyoxylsäure, die als Zwischenprodukt bei der von der Glykolsäureoxidase katalysierten Reaktion auftritt, auf einem anderen Weg abgebaut, als die Glyoxylsäure, die den Tieren injiziert wird oder von anderen Vorstufen stammt. (47)

1.3. Steinbildung und Oxalsäure

1.3.1. Oxalatsteinbildung beim Tier

Eine wichtige Begleiterscheinung des experimentell erzeugten Pyridoxinmangels ist außer der Oxalurie das Auftreten von Ca- Oxalatablagerungen in der Niere. (20)

Ebenso kommt es nach Belastung mit Äthylenglykol und Oxalsäure (52) zur Oxalatnephrocalcinose, die histologisch einer Oxalatnephrocalcinose, wie sie bei der idiopathischen Oxalosis des Menschen vorkommt, gleicht.

Die Kristalle treten hauptsächlich in der Rinde und zwar vorwiegend in den distalen Tubuli auf. Die betroffenen und die umliegenden Tubuli sind häufig erweitert. Das Epithel ist abgeflacht und atrophisch; Tantret (52) konnte auch Lipoideinlagerungen nachweisen. Die Glomeruli zeigten meistens keine Veränderungen. Eine bemerkenswerte interstitielle Entzündung konnte bei den Versuchstieren nicht festgestellt werden. Im weiteren Verlauf der Krankheit jedoch zeigten sich entzündliche und degenerative Veränderungen, wie sie bei jeder Nephrolithiasis vorkommen können. (18)

1.3.2. Oxalatsteinbildung beim Menschen

Die Steinkrankheit der Niere, die Nephrolithiasis, war schon im Altertum den Ärzten bekannt. Trotz ständiger Forschungsarbeit ist es bis heute in den meisten Fällen noch nicht gelungen, die Ursache dieses Leidens zu ergründen.

Den Anstoß zur Steinbildung können lokale Schädigungen der Niere, Stoffwechselerkrankungen (Gicht, primärer Hyperparathyreoidismus usw.) und Infektionskrankheiten geben.

Die Steinbildung wird auch durch Verminderung der Diurese begünstigt, denn geringe Urinmengen pro Zeiteinheit erleichtern das Ausfallen der Harnsubstanzen und hemmen die Ausschwemmung kleiner Steine, so daß sie leicht anwachsen können.

Das Aussehen und die Zusammensetzung der Steine ist unterschiedlich. Als Bestandteile wären zu nennen: Harnsäure, Ca-Oxalat, Apatit, Cystin, Brushit, Struvit - wobei diese Substanzen selten in reiner Form vorkommen.

80 % der Steine bestehen aus Ca-Oxalat und Ca-Oxalat plus Apatit.

Im Rahmen dieser Arbeit soll auf die Steinleiden näher eingegangen werden, deren Entstehung mit einer erhöhten Oxalatbildung im Organismus zusammenhängt, wie z.B. die primäre Hyperoxalurie (1.3.2.1.) und die Steinbildung nach Äthylenvergiftungen (1.3.2.3.)

Möglicherweise haben auch bestimmte Kostformen einen Einfluß auf den Oxalatstoffwechsel und damit auf die Entstehung von Steinen, wie es das gehäufte Auftreten von Steinen in gewissen Entwicklungsländern vermuten läßt. (1.3.2.2.)

1.3.2.1. Primäre Hyperoxalurie

Das Krankheitsbild umfaßt folgende Symptome:

- a) Hyperoxalurie (Oxalatausscheidung im Urin von 70 bis mehr als 120 mg/24 Std./Person)
- b) Nephrolithiasis
- c) Nephrocalcinose

Calciumoxalatablagerungen werden bei der Sektion häufig in extrarenalen Geweben gefunden. Man spricht dann von einer Oxalosis.

Die primäre Hyperoxalurie tritt vorwiegend bei Kindern auf.

Die oben angeführten Symptome beginnen vor dem 10. Lebensjahr und führen zum Tod im Nierenversagen. Kaum ein Patient erreicht das 20. Lebensjahr. (27, 15, 32)
Eine in ihrem Erscheinungsbild ähnliche aber mildere Form der Hyperoxalurie wurde auch bei Erwachsenen diagnostiziert.

Pathologisch-anatomisch zeigt die Niere im Querschnitt eine mit kleinen, gelbbraunen Granula durchsetzte Fläche. Granula kommen meist in der Rinde vor.

Mikroskopisch findet man Rosettenartig angeordnete Ca-Oxalatkristalle in den Tubuli der Rinde. Hier weisen außerdem fleckenhafte Nekrosen auf das Vorhandensein der Kristalle hin. In schwerwiegenden Fällen sind Ca-Oxalatkristalle auch im interstitiellen Gewebe zu finden. Man vermutet, daß die zunächst in den Tubuli gelegenen Kristalle nach der Zellnekrose in das Interstitium gewandert sind. Die Struktur der Rinde läßt sich in diesen Fällen nicht mehr nachweisen. Interstitielle Entzündungen und Schäden der Glomeruli treten häufig auf (26).

Chemisch bestehen die aus der Niere entfernten Steine aus Ca-Oxalat. Größere Steine zeigen Maulbeerform, kleinere eine durch hervortretende Kristalle zackige Oberfläche. Die Konsistenz ist fest, die Steine jedoch zerreibbar.

Die Ursache der primären Hyperoxalurie ist vermutlich ein genetisch bedingter Defekt des Oxalsäurestoffwechsels, der einen autosomalen rezessiven Charakter trägt. (26)
Stoffwechseluntersuchungen an Patienten und an gesunden

Personen führten bisher zu folgenden Ergebnissen:

1. Bei der Hyperoxalurie liegt keine erhöhte Oxalatabsorption aus dem gastro-intestinalen Trakt und keine vermehrte Oxalataufnahme vor. Eine erniedrigte Nierenschwäle für Oxalat konnte auch nicht nachgewiesen werden. (4,15)
2. Nach Injektion von markiertem Glyoxalat war die Oxidation zu $^{14}\text{CO}_2$ bei Patienten im Vergleich zu Kontrollen verringert, der Einbau von markiertem Kohlenstoff in Glykolsäure und Oxalsäure, die im Urin bestimmt wurden, vermehrt. (15)
3. Die Glycinsynthese aus markiertem Glyoxalat war im Nierenhomogenat von Patienten verringert - injiziertes markiertes Glyoxalat und Glykolat wurde bei den Patienten auch wesentlich langsamer in Glycin umgewandelt als bei den Kontrollen (55)
4. Tryptophangaben an Patienten führten zu einem Anstieg der Xanthurensäure, was auf einen möglichen Pyridoxinmangel schließen läßt. Nach Verabfolgung von Pyridoxin wurde die Xanthurensäureausscheidung wieder normal.

Das Erscheinungsbild eines experimentellen Pyridoxinmangels ähnelt sehr dem der primären Hyperoxalurie, so daß ein Pyridoxinmangel und somit eine verminderte enzymatische Transaminierung von der Glyoxylsäure zu Glycin als eine Ursache für das Auftreten der Hyperoxalurie in

Frage kommt. (32)

Möglicherweise ist die Überproduktion von Oxalat auf eine Überproduktion von Glyoxalat zurückzuführen.

1.3.2.2. Durch Nahrungsfaktoren verursachte Steinbildung

Steinleiden häufen sich in Gegenden der Welt, die bestimmten Breitengraden zugeordnet werden können. Zu diesen Gebieten gehören: Ägypten, Saudiarabien, Nordwestindien, Indonesien, Thailand, Vietnam, Südchina und Südeuropa.

Mit steigendem Lebensstandard wird die Zahl der erkrankten Personen geringer. (16) So ist auch in Mitteleuropa in den letzten 50 Jahren eine starke Abnahme des Steinleidens zu beobachten. Ernährungsfaktoren spielen bei dieser Entwicklung eine Rolle.

Gershoff und Frien haben im Nordosten Thailands vergleichende Untersuchungen an unter Blasensteinen leidenden und an gesunden Kindern durchgeführt. (23) Die kranken Kinder stammten aus einem Dorf, in dem die Nährstoffversorgung völlig unzureichend war, während die gesunden Kinder in einem nahe gelegenen Internat lebten und mit vollwertigen Nahrungsmitteln ernährt wurden.

Tabelle 7 zeigt das Ergebnis von Urinanalysen beider Gruppen.

Tabelle 7: Im Urin ausgeschiedene Metaboliten

mg/g Creatinin	Stadt	Land	P-Wert
Oxalsäure	33,0 $\pm$ 3,8	56,7 $\pm$ 5,6	.005
Xanthurensäure	4,4 $\pm$.6	10,9 $\pm$ 3,0	.05
Citronensäure	154 $\pm$ 26	281 $\pm$ 48	.05
Magnesium	65 $\pm$ 8	52 $\pm$ 8	
Harnsäure ⁺	171 $\pm$ 27	475 $\pm$ 112	.02

+) Harnsäureanalysen von 23 Kindern (14 Land, 9 Stadt)

Der Oxalsäure, Xanthurensäure, Citronensäure und Harnsäuregehalt im Urin war bei den Landkindern im Vergleich zu den Stadtkindern erhöht.

Thiamin- und Riboflavinmangel sind im Nordosten Thailands häufig festgestellt worden und die erhöhten Werte der Xanthurensäureausscheidung deuten darauf hin, daß das Pyridoxinangebot den Bedarf nicht deckt.

Experimentelle Untersuchungen an Ratten haben gezeigt, daß Mengen an Pyridoxin, die gerade noch ein normales Wachstum gewährleisten, Ca-Oxalatablagerungen in der Niere nicht mehr verhindern können.

Ein Mangel an Nährstoffen, kombiniert als auch isoliert, könnte also für die erhöhte Oxalatsynthese mit nachfolgender Steinbildung mitverantwortlich sein.

Die Steine bestanden hauptsächlich aus Ammoniumurat und Ca-Oxalat. (23)

Die von Andersen in Indien untersuchten Fälle mit Blasensteinen traten ebenso wie in Thailand in einer Bevölkerungsgruppe auf, die in landwirtschaftlich armen Gebieten wohnt und sich hauptsächlich von pflanzlichen Produkten ernährt (23 - 24 oz. Hirse/Erwachsener/Tag). (2) Zwar sind die Kalorienzufuhr und die pflanzliche Proteinzufuhr gesichert, der Gehalt an tierischem Protein, Fett und Öl ist jedoch unzulänglich.

Möglicherweise trägt eine Aminosäureimbalance, sei es, daß eine Aminosäure in zu hohen Mengen vorkommt oder nicht ausreichend vorhanden ist, kombiniert mit einem Mangel an einem Vitamin der B-Gruppe, wahrscheinlich Pyridoxin, zur Steinbildung bei.

Lebercirrhosen und Pellagra werden in diesem Gebiet häufig beobachtet.

Auch Moulin konnte bei seinen vietnamesischen Patienten häufig Nieren- und Blasensteine diagnostizieren. Ein bedeutender Faktor bei der Entstehung von Steinen schien ihm eine hypocalorische-proteinarme oxalatreiche Nahrung zu sein.

In dieser Gegend begünstigen außerdem die Beschaffenheit des Wassers, eine zu geringe Flüssigkeitsaufnahme mit nachfolgender Oligurie und Infektionen die Steinbildung. (34)

1.3.2.3. Äthylenglykolvergiftungen

Von tödlichen Äthylenglykolvergiftungen (40 - 60 Fälle pro Jahr) wird in den Vereinigten Staaten berichtet. Glykol wird als Gefrierschutzmittel und als Lösungsmittel verwendet. Die akute Glykolvergiftung äußert sich in Störungen des Z.N.S., Hämolyse und einer Tubularnekrose in der Niere; bei der chronischen Vergiftung kommt es zu einer verminderten Gewichtszunahme und zu Ablagerungen von Oxalatsteinen in der Niere (16, 18)

1.3.3. Faktoren, die die Steinbildung hemmen

Bei der Therapie der Urolithiasis ist man darauf angewiesen, die Löslichkeitsverhältnisse im Harn so zu beeinflussen, daß eine Steinbildung verhindert wird.

Dazu ist eine genaue Kenntnis der Löslichkeitsprodukte der einzelnen Ionen im Urin notwendig, denn die Ionenkonzentration des Urins beeinflusst die Löslichkeit der Harnsalze. (40)

Die Salzbildung der Ca-Oxalatsalze hängt in erster Linie von sich im Harn befindlichen Lyotropen Substanzen ab. Diese bilden mit den Ca-Ionen leicht lösliche, wenig dissoziierte Komplexsalze, so daß die Ca-Ionen nicht mehr für eine schwerlösliche Verbindung mit Oxalat- oder Phosphationen zur Verfügung stehen. Solche Lyotrope Substanzen sind: Glycin, Alanin, Glukuronsäure, anorganisches Pyrophosphat, Magnesium und Citronensäure.

Pyrophosphat kann in so kleinen Mengen wie 10^{-5} M die minimale Konzentration von Calcium und Oxalat, die zur Kristallbildung von Ca-Oxalat nötig ist, erhöhen. (13)
Die im Urin gesunder Personen nachweisbaren Mengen von 10^{-5} - 10^{-4} Mol/l genügen also, um die Kristallisation von Ca-Oxalat zu verhindern. (49)

Magnesium steigert durch Komplexbildung die Löslichkeit des Ca-Oxalats bis auf das 20fache.

Versuche an Patienten, die wiederholt Ca-Oxalatsteine ausschieden, zeigten, daß Magnesium für die Therapie sehr geeignet ist.

30 Patienten erhielten über verschieden lange Zeitperioden 200 mg Magnesiumoxyd und 10 mg Pyridoxin. Zum Abschluß der Behandlung (nach 5 Jahren) traten Steine fast gar nicht mehr oder nur noch selten auf. (22)

In experimentellen Versuchen an Ratten, die Pyridoxinfrei ernährt wurden, bewirkten hohe Gaben von Magnesium (400 mg/100 g Kost) eine verminderte Ablagerung an Ca-Oxalatkristallen. (17)

Völligen Schutz gegen Ca-Oxalatablagerungen boten hohe Magnesiumoxydgaben bei mit Äthylenglykol belasteten Ratten. (18)

Die normalerweise im Harn ausgeschiedene Citronensäure (678 mg/24 Std. Urin/Erwachsener) kann etwa 15 - 30 mg Ca binden.

Bei Patienten mit Steinleiden liegt die Citronensäureausscheidung im Harn meist unter den Normalwerten (21, 22)

Ein günstiger Effekt auf die verminderte Ca-Oxalatbildung scheint ebenso vom Pyridoxin auszugehen. (21, 22)

2. Material und Methoden

2.1. Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten männliche Ratten, die zum Teil aus eigener Zucht (Nachkommen des Stammes Royal Wistar), zum Teil aus einer gewerblichen Zucht (Stamm Royal Wistar) bezogen wurden.

Die Tiere aus eigener Zucht wurden für Glyoxalatuntersuchungen im Leberhomogenat verwandt, während alle anderen Versuche an Ratten des Stammes Royal Wistar durchgeführt wurden.

Bei den Versuchen war es notwendig, folgende Mangelzustände bei den Ratten experimentell zu erzeugen:

- a. Thiaminmangel
- b. Calorienmangel
- c. Proteinmangel
- d. Pyridoxinmangel
- e. Pyridoxin-und Thiaminmangel

a. Thiaminmangel

Die Ratten wogen (100) bzw. 130 g. Sie erhielten (2) bzw. 3 Wochen eine Thiaminfreie Kost und wurden, sobald ein Stillstand in der Gewichtsentwicklung eintrat, mit (110) bzw. 160 g in den Versuch genommen. Die Zahlen in Klammern gelten für die Tiere, an denen Homogenatuntersuchungen durchgeführt wurden.

b. Calorienmangel

130 g schwere Tiere erhielten 6 Tage 5 g einer vollwertigen, halbsynthetischen Kost. Zu Beginn des Versuches wogen sie ungefähr 100 g.

c) Proteinmangel

Das für den Versuch erforderliche Gewicht von 100 g wurde nach 14 tägiger Aufnahme einer proteinfreien Kost erreicht. Das Ausgangsgewicht betrug 130 g.

d. und e. Pyridoxinmangel und Pyridoxin- u. Thiaminmangel

Beide Tiergruppen hatten ein Anfangsgewicht von 130 g - während es bei einem Pyridoxinmangel 6 Wochen dauerte, bis ein Stillstand in der Gewichtsentwicklung eintrat, machte sich ein Mangel an Thiamin und Pyridoxin schon nach 3 Wochen bemerkbar.

Beide Tiergruppen wurden mit 160 g in den Versuch genommen. Sämtlichen Versuchsgruppen wurden gleich schwere Kontrollgruppen, die ein vollwertiges halbsynthetisches Futter erhielten, gegenübergestellt.

2.2. Tierfutter

Als Versuchsfutter wurde eine im Institut übliche halbsynthetische Kost gewählt.

2.2.1. Grundfutter

Das Grundfutter (vollwertig, halbsynthetisch) besteht aus folgenden Komponenten (Angaben für 100 g Futtermischung):

60,0 g	Saccharose (davon die Hälfte gemahlen)
5,8 g	Reisstärke
20 g	Casein
7 g	gereinigtes Butterfett (vitaminiert mit A,D,E)
4,0 g	Mineralstoffmischung
0,2 g	Methionin
1,0 g	Reisstärke + 0,2 g Cholinchlorid
2,0 g	Reisstärke mit B-Vitaminen
100 g	Futter

Dem Butterfett werden, nachdem es erhitzt wurde, beim Abkühlen folgende Vitamine zugesetzt:

Pro 7 g Butterfett oder 100 g Futter

1000 I.E.	Vitamin A
130 I.E.	Vitamin D (als D ₂ , ölig)
10 mg	DL- - Tocopherolacetat

Dies entspricht bei Verwendung folgender Präparate (Bezugsquelle Hoffmann-La-Roche) den nachstehenden Mengenangaben:

"Vitamin-A-Palmitat 1 Mill. I.E./g"	1 mg
"Vitamin-D ₂ , ölig 400 000 I.E./ml"	0,000325 ml oder 0,298 mg (s=0,916)
"DL- - Tocopherolacetat DAB 6 pur"	10 mg

Mineralstoffmischung

I	222,2 g Citronensäure
II	269,6 g Calciumcarbonat 57,8 g Magnesiumcarbonat (40 % MgO) 68,4 g Natriumcarbonat (wasserfrei) 282,6 g Kaliumcarbonat
III	40 mg Kaliumjodid 234 mg Mangansulfat · 4 H ₂ O 124 mg Natriumfluorid 88 mg Alaun KAl (SO ₄) ₂ · 12 H ₂ O
IV	14,88 g Eisencitrat (17,5 % Fe) 296,6 g Salzsäure (36 %)
V	19,2 g Schwefelsäure (96 %) 238,6 g Phosphorsäure (86,5 %)

Arbeitsgang:

Zu 600 ml kochendem destillierten Wasser werden 222,2 g Citronensäure (I) gegeben. Diese Lösung wird heiß unter die Carbonate (II) gerührt. Die Spurenelemente (III) werden in destilliertem Wasser gelöst und ebenfalls hinzugegeben. Das Eisenzitrat wird in einem Mörser zerrieben, in der erhitzten Salzsäure gelöst und in die bereits angerührte Mischung gebracht. Danach werden noch die Schwefelsäure und Phosphorsäure hinzugefügt. Das Zubereiten der Mischung geschieht unter ständigem Rühren, um das CO₂ zu entfernen.

Die fertige Mischung wird in flache Schalen gefüllt und 2 Tage lang im Wärmeschrank bei 90°C getrocknet. Nach diesem Vorgang wird sie zu Staubkörngröße gemahlen.

Das Cholinchlorid wird wegen seiner Hygroskopischen Eigenschaften mit Reisstärke vermischt.

Vitaminmischung II (pro 100 g Grundfutter)

Thiamin	0,5	mg
Riboflavin	1,0	mg
Pyridoxin	0,5	mg
Pantothensäure	5,0	mg
Inosit	40,0	mg
Cobalamin	0,002	mg
Niacin	10,0	mg
P A B	10,0	mg
Biotin	0,030	mg
Folsäure	0,5	mg
Menadion	1,0	mg
Ascorbinsäure	18,0	mg

Die Vitamine werden mit Reisstärke gemischt, dem Grundfutter zugegeben und alles zusammen wird in einem Spezialmischer vermengt.

2.2.2. Thiamin-, Pyridoxin-, Thiamin- und Pyridoxinmangelfutter

Das Thiamin-, Pyridoxin-, Thiamin- und Pyridoxinfreie Futter wurde aus dem Grundfutter hergestellt. Bei der Vitaminisierung wurde das für den gewünschten Mangelzustand verantwortliche Vitamin weggelassen.

2.2.3. Proteinfreies Futter

Das Proteinfreie Futter hat folgende Zusammensetzung:

Saccharose	40,1 g	
Puderzucker	40,1 g	
Reisstärke	5,8 g	
Butterfett	7,0 g	(wird mit Vitamin A 1 mg Vitamin E 10mg Vitamin D ₂ 0,3 mg versetzt)
Mineralstoff- mischung	4,0 g	
Cholinchlorid- mischung	1,0 g	(0,2 g Cholinchlorid wird mit 0,8 g Reis- stärke vermischt)
Reisstärke und Vitamine	<u>2,0 g</u>	
	100,0 g	

Die Vitaminmischung III (200 %) wird mit Reisstärke vermischt.

Vitaminmischung III (pro 100 g Futter)

Thiamin	0,2	mg
Riboflavin	0,3	mg
Pyridoxin	0,3	mg
Pantothensäure	1,0	mg
Inosit	4,0	mg
Cobalamin	0,0008	mg
Niacin	3,0	mg
P A B	6,0	mg
Biotin	0,020	mg
Folsäure	0,040	mg
Menadion	0,015	mg
Ascorbinsäure	10,0	mg

2.2.4. Altromin

Zusammensetzung von Altromin:

Gerste	45 %
Hafer, geschr.	18 %
Mais, geschr.	10 %
Fischmehl	6 %
Fleischfuttermehl	6 %
Bierhefe, getr.	5 %
Luzernegrünmehl	4 %
Weizenkeime, verkl.	4 %
Mineral- und Wirkstoffe	3 %
	100 %

2.3. Tierhaltung

Die vom Züchter bezogenen Tiere wurden zunächst 2 - 3 Tage zur Eingewöhnung in Sammelkäfigen mit Hobelspäne-Einstreu gehalten.

Die Tiere wurden während dieser Zeit genau beobachtet und schwache oder kränkelnde Tiere ausgeschieden.

Nach der Eingewöhnungszeit kamen die Tiere in Einzelkäfige mit Maschendrahtboden. Diese Käfige haben den Vorteil, daß eine Koprophagie weitgehend verhindert wird, die Tiere besser beobachtet werden können und ein gegenseitiges Auffressen nicht möglich ist.

Die Tiere erhielten ein bestimmtes Mangelfutter und blieben so lange in den Käfigen, bis ein Stillstand in

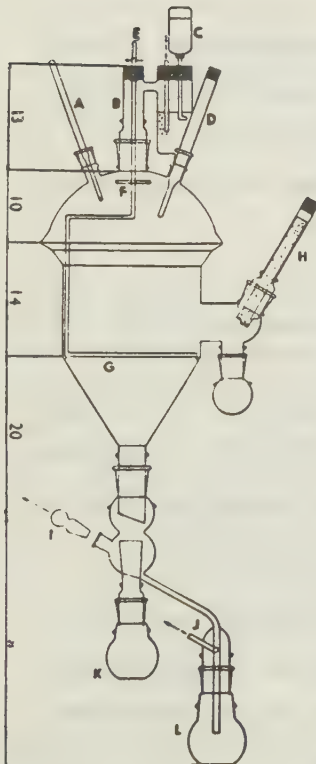
der Gewichtsentwicklung eintrat.

Dann wurden sie je nach Versuchsanordnung entweder dekapiert oder in Stoffwechselkäfige umgesetzt.

Versuche mit markierten Substanzen wurden in luchtdicht abschließbaren, von der Firma Altromin entwickelten Stoffwechselkäfigen durchgeführt. S. Abb. 4.

Abb. 4

STOFFWECHSELKÄFIG



- | | |
|---|---|
| A | Thermometer |
| B | Ansatzstück für den Wasserverschluß |
| C | Gefäß für die automatische Regelung des Wasserspiegels im Wasserverschluß |
| D | Tränkröhre |
| E | Leitung des Oberteils des senkrechten Armes des Bodeneinsatzes |
| F | Kunststoffplättchen, das die zuströmende Luft längs der Käfigwände verteilt |
| G | Kunststoffbodeneinsatz |
| H | Futterröhre |
| I | Öffnung zum Absaugen der Luft |
| J | Röhrchen zum Entlüften des Harnkolbens beim Ausspülen des Käfigs |
| K | Kolben für Kot |
| L | Kolben für Harn |

Trinkwasser und Futter wurden ad libitum verabreicht. Die täglich verbrauchte Flüssigkeitszufuhr ließ sich mit Hilfe graduierter Trinkwasserröhren bestimmen.

3. 4. Leberaufarbeitung

3.4.1. Aufarbeitung des Homogenats ohne Zugabe von Glyoxalat

Die Thiaminfrei ernährten Tiere werden, sobald ein Stillstand in der Gewichtsentwicklung eintritt, dekapitiert.

Die Leber wird herausgenommen, in Eis gelegt, gewogen und 2 g Leber werden weiterverarbeitet.

Zusammen mit 5 ml HClO_4 (6 %), 2 ml H_2O und einer Spatelspitze EDTA homogenisiert man die Leber ungefähr 5 Min. unter ständiger Kühlung.

Das Homogenat wird 20 Min. in der Kühlzentrifuge (10.000 Umdrehungen/Min.) zentrifugiert und danach der Überstand mit 18 %iger KOH neutralisiert. (pH - 6,5 - 7)

Nach nochmaligem Zentrifugieren werden von dieser Lösung 0,5 ml zum Test verwandt.

3.4.2. Aufarbeitung des Homogenats unter Zugabe von Glyoxalat

Der Arbeitsgang bis zum Wiegen der Leber ist gleich dem Obenbeschriebenen. Anstatt 2 g Leber werden 3 g weiterverarbeitet. Sie werden unter ständiger Kühlung mit 19,5 ml (g Leber x 6,5) Krebs-Ringer Medium homogenisiert.

Außer 2 ml des Homogenats werden 1 ml Medium und 0,1 ml Glyoxylsäure-Lösung (0,1 M = 10 μMol) in Warburggefäße pipettiert. Die Gefäße stehen in Eis. In die Mitte der Gefäße wird 0,2 ml 2 N NaOH gegeben.

Die Gefäße werden 5,10, bzw. 15 Min. bei 37°C im Warburg-

apparat inkubiert. Nach der Inkubation wird die Reaktion mit 1 ml 20 %iger Perchlorsäure gestoppt, die Natronlauge entfernt, das Homogenat in gekühlte Reagenzgläser gegeben und 30 Min. bei ungefähr 10.000 U/Min. zentrifugiert.

Vom Überstand werden 2 ml in graduierte Zentrifugengläser pipettiert, mit 20 %iger KOH neutralisiert ($\text{pH} = 7$) und nach Auffüllen mit bidestilliertem Wasser auf 3 ml, nochmals zentrifugiert.

Keine Inkubation erfolgt zur Bestimmung des Ausgangswertes, der als Bezugswert in die Rechnung eingeht.

Hierbei werden nacheinander in ein in Eis stehendes Reagenzglas gegeben:

- 0,2 ml Glyoxylsäure
- 1 ml Medium
- 1 ml Perchlorsäure (20 %ig)
- 2 ml Homogenat.

Nach Zugabe des Homogenats muß sofort alles gemischt und gekühlt werden.

Es folgt das Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge und dann die übliche Weiterverarbeitung.

Nach dem letzten Zentrifugieren werden 0,2 ml bzw. 0,5 ml (s. 2.4.1.) vom Überstand (Probe) zum Test verwandt.

Die Probe wird zusammen mit

- 1 ml Phosphatpuffer (0,1 M $\text{pH} = 6,4$)
- 1,93 ml bidest. H_2O - Probe
- 0,05 ml NADPH (10 mg in 1 ml 5 %ige NaHCO_3 -Lösung lösen)

in Küvetten pipettiert. Die Schichtdicke der Küvette beträgt 1 cm und das Meßvolumen nach Zugabe der Glyoxylsäurereduktase (Hauptwert) 3 ml.

Um den Leerwert zu bestimmen, werden mit Ausnahme der Glyoxylsäurereduktase die gleichen Substanzen in die Küvette pipettiert, wie sie zur Bestimmung des Hauptwertes verwendet werden.

2.4.3. Meßmethode und Berechnung

Das Prinzip der Bestimmungsmethode besteht darin, daß die Glyoxylsäure durch NADH mit Hilfe der Glyoxylsäurereduktase in Glykolsäure und NAD übergeführt wird (7).



Die Messung der Abnahme der NADH-Extinktion erfolgt im Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 366 mμ.

Nach gutem Schütteln der Küvetten wird sowohl die Anfangs-extinktion des Hauptwertes E_1 als auch die des Leerwertes EL_1 abgelesen. Dann gibt man nur in den Hauptwert 0,02 ml Glyoxylsäurereduktase (Verdünnung 1:4, 0,1 ml Glyoxylsäurered. + 0,4 ml 1,5 M Ammoniumsulfatlösung) und mißt die Extinktionen nach einer Zeit noch einmal, nach der die Extinktion nicht mehr abnimmt. ($E_2 + EL_2$)

Der Anfangswert des Hauptwertes (E_1) wird von dem Endwert des Hauptwertes (E_2) subtrahiert - von diesem Wert wird wieder die Differenz aus Anfangs- (EL_1) und Endwert (EL_2) des Leerwertes abgezogen.

$$(E_1 - E_2) - (EL_1 - EL_2) = \Delta E \text{ Glyoxylsäure.}$$

Der Endwert ΔE geht in die Berechnung ein.

Ist das Homogenat inkubiert worden, so muß die Differenz

aus Anfangs- und Endwert der Extinktion des Ausgangswertes berücksichtigt werden.

Für diesen Fall soll ein Rechenbeispiel angeführt werden:

A = Ausgangswert

L = Leerwert

$$\Delta E \text{ Glyox.} = (EA_1 - EA_2) - [(E_1 - E_2) - (EL_1 - EL_2)]$$

Es ist für den Küvetteninhalt von 3 ml bei 366 mμ

$$\frac{\Delta E \text{ Glyox.} \cdot 3}{3,3} = \mu\text{M Glyoxylsäure / Testansatz.}$$

Um zu berechnen, wieviel μM Glyoxylsäure pro mg Protein pro Leber enthalten sind, sind die während des Versuchsablaufes eingetretenen Verdünnungen zu berücksichtigen.

ΔE wird mit dem Verdünnungsfaktor $\frac{7,5 \cdot 4,1 \cdot 3 \cdot 3}{2 \cdot 2 \cdot 0,2 \cdot 3,3} = 106,2$ multipliziert und man erhält die Menge μM Glyoxalat/g Frischleber.

Nachdem man festgestellt hat, wieviel mg Protein ein g Frischleber enthält, läßt sich die ermittelte Menge μM Glyoxalat /g Frischleber auf μM Glyoxalat/mg Protein umrechnen.

2.4.4. Proteinbestimmung (Biuretmethode) (6)

Die eisgekühlte Leber wird gewogen und 2 g davon werden mit 16 ml Wasser homogenisiert. 4 ml von dem Homogenat werden noch einmal mit 20 ml H_2O homogenisiert. Von diesem Homogenat nimmt man 0,1 ml ab, gibt sie in dicke Zentrifugengläser, in die man ebenso 0,9 ml Wasser und 0,15 ml Trichloressigsäure (50 %) pipettiert. Das ganze wird

15 Min. bei 4000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert, dann gießt man den Überstand ab und läßt das Glas austrocknen.

Zu dem Rückstand gibt man 10 ml Biuret, schüttelt die Gläser gut um, und läßt sie so lange stehen, bis sich der Rückstand vollkommen gelöst hat; dann wird noch einmal umgeschüttelt und im Eppendorf-Photometer gemessen.

Von den 10 ml der Probe füllt man eine Küvette von 2 cm Schichtdicke und mißt die Extinktion (E_{Pr}) gegen Biuret-reagenz als Bezugswert (E_B).

Von dem Extinktionswert der Probe wird der Extinktionswert des Bezugswertes subtrahiert. Die Differenz ΔE wird multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor, mit dem Umrechnungswert von Aminosäuren auf Protein und mit dem Faktor 10, um auf die in einem ml Probe enthaltene Menge Protein schließen zu können.

Herstellung der Biuretreagenz:

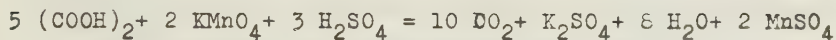
9 g Seignettesalz werden in etwa 0,2 n NaOH (carbonatfrei, aus gesättigter abgestandener NaOH bereitet) gelöst, dann nacheinander zu dieser Lösung 3 g feingepulvertes $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ p.a. und 5 g KJ p.a. hinzugefügt. Jedes der Salze muß jeweils vor dem Hinzufügen des nächsten gelöst sein. Die Mischung wird mit 0,2 n NaOH auf 1000 ml aufgefüllt. Sie ist in einer braunen Flasche sehr lange haltbar.

2.5. Oxalsäurebestimmung im Rattenurin

2.5.1. Titrimetrische Bestimmung der Oxalsäure (29)

Prinzip: Die im Urin vorhandene Oxalsäure wird als Ca-Oxalat gefällt, in Schwefelsäure gelöst und titrimetrisch mit Hilfe von KMnO_4 bestimmt.

Die Oxidation der Oxalsäure erfolgt nach der summarischen Gleichung:



Arbeitsvorgang: Der im Beshier gesammelte 24 Std.Urin wird nach vorherigem Zugabe von 1 ml Perchlorsäure (10 %) in ein graduiertes Zentrifugenglas gegeben und das Zentrifugenglas mit destilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt. (Die Perchlorsäure fällt etwaig vorhandenes Eiweiß aus und bringt als Sediment vorhandenes Ca-Oxalat in Lösung).

Die Zentrifugengläser werden 5 Min. bei 65°C im Wasserbad erhitzt, in Eis abgekühlt und 5 Min. bei ungefähr 4000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert. (Der Harn wird erhitzt, um vielleicht an organische Basen gebundene Oxalsäure mitzubestimmen. Eine Zersetzung der Oxalsäure bei dieser Temperatur konnte nicht festgestellt werden, Bildung von Oxalsäure zu Oxalursäure findet bei dieser Temperatur auch in saurer Lösung nicht statt. Oxamid, welches Oxalsäure liefern könnte, ist nicht unzersetzt im Harn anzunehmen. Beim Abkühlen wird die beim Erwärmen in Lösung gebrachte Harnsäure wieder ausgefällt.)

Vom Überstand werden 8 ml abgenommen (Vollpipette) und mit 25 %iger KOH neutralisiert (pH 7). Zum genauen Einstellen des pH dient ein pH Meßgerät. Nach nochmaligem Zentrifugieren (5 Min. 4000 Umdrehungen/Min. - KClO_4 wird abzentrifugiert -) werden 6 ml vom Überstand abgenommen (Vollpipette) eine Spatelspitze Na-acetat dazugegeben und mit 1 n Essigsäure angesäuert, bis der für die Fällung günstigste pH 5 - 5,5 erreicht ist. (Es kommt darauf an, die Ionenkonzentration der Lösung möglichst klein zu halten. Essigsäure ist nur schwach dissoziiert und Ca-Oxalat ist praktisch unlöslich in der verdünnten Säure.

Na-acetat drückt die Ionenkonzentration herab. Aus diesem Grunde wird die Fällung auch mit Ca-Acetat statt eines anderen Ca-Salzes vorgenommen. Es soll nämlich vermieden werden, daß mit stark dissoziierten Mineralsäuren oder stark in Ionen gespaltenen Salzen gearbeitet wird, die zur Lösung des Ca-Oxalats beitragen.)

Zur Fällung des Oxalats werden 0,1 ml Caacetat (10 %) dazugegeben, der Urin kräftig umgeschüttelt und 12 Std. im Eisschrank stengelassen. Der kristallinisch ausgefallene Ca-Oxalatniederschlag wird 5 Min. bei 4000 Umdrehungen/Min. abzentrifugiert und die darüberstehende Flüssigkeit mit einer Pipette abgesaugt. Es folgen zwei Waschoperationen mit je 1 bis 2 ml Flüssigkeit, erstens mit 0,5 % Lithiumacetat und dann mit 0,5 %igem ammoniakalischen Wasser. Der Niederschlag wird jeweils mit der Waschflüssigkeit abgesaugt. (Das Waschen ist nötig, um eingeschlossene Spuren von Harnfarbstoffen, etwa ausgefälltes

Cystin u.a. und Spuren von in saurer Lösung mitausgefällter Harnsäure zu entfernen.)

Nach dem Absaugen des letzten Waschwassers wird der Niederschlag in 0,5 ml 20 %iger H_2SO_4 (heiß) gelöst, in einen Erlenmeyerkolben gebracht und mit 2 ml H_2O nachgespült. Außerdem kommen einige Tropfen 1 %iger Mn^{++} -Lösung hinzu (Katalysator). Die Titration erfolgt mit n/100 KMnO_4 -Lösung.

Berechnung:

$$\text{"x" ml } \frac{n}{100} \text{ Kmno}_4 \cdot 0,45 \cdot 1,6 \text{ (Verdünnungsfaktor) = mg Oxalsäure/Probe.}$$

2.5.2. Radiochemische Bestimmung der Oxalsäure

Arbeitsvorgang:

Der in den Kolben aufgefangene 24 Std.-Urin wird zur Bestimmung des Volumens in einen 25 ml Maßzylinder gegeben. Nach Bestimmung des pHs füllt man den Urin enthaltenden Maßzylinder mit destilliertem Wasser bis zur 20 ml Marke auf.

In 3 graduierte Zentrifugengläser werden je 6ml von den 20 ml gegeben und dazu in jedes Glas 1 ml 10 % HClO_4 . Die Zentrifugengläser werden in Eis gestellt und dann in einer Kühlzentrifuge 20 Minuten bei 8000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert. Der Überstand wird in Zentrifugengläser abgegossen und mit 25 % KOH neutralisiert (pH - 7). Nachdem die Proben mit einem halben Tropfen konz. HCl angesäuert wurden, (pH 3 - 4) läßt man sie 12 Std. im

Kühlraum stehen. Die Proben werden dann erneut in der Kühlzentrifuge bei 8000 Umdrehungen/Min. 20 Min. lang zentrifugiert. Den Überstand gibt man in Zentrifugengläser und versetzt ihn mit 1 ml Acetatpuffer (pH 5,5 - 6), so daß im Endeffekt der pH der Proben ungefähr 5 - 5,5 beträgt.

Die Fällung erfolgt mit 0,1 ml 10 %iger Ca-Acetatlösung. Damit die Fällung vollständig ist, gibt man pro Probe noch 0,4 ml Oxalsäure (0,5 mg/ml) hinzu.

Die Proben werden gut umgeschüttelt und 12 Std. im Kühlraum stehengelassen. Das Absaugen des Niederschlags erfolgt über einen Membranfilter ($\varnothing$ 25 mm) mit Hilfe einer Nutsche und einer Wasserstrahlpumpe. Nachgespült werden die Gläser mit Acetatpuffer. Die den Niederschlag enthaltenden Filter werden auf kleine Metallschälchen festgeklebt und nachdem sie getrocknet sind im Methandurchflußzählrohr gemessen.

Berechnung:

Die Impulsrate/Min. von je drei zusammengehörenden Proben wird addiert und von dieser Summe der dreifache Nulleffekt subtrahiert.

Das Ergebnis wird mit dem Verdünnungsfaktor 1,1 multipliziert und ergibt die Impulsrate/Min./24 Std. Urin/Tier.

1 μ C Glyoxyl - 1-¹⁴C- säure wurde pro Tier verabreicht - bei einer Ansprechwahrscheinlichkeit des Zählrohrs von 52 - 54 % sind das 1,164.421 Imp/Min.

Aus dieser Zahl und der gezählten Impulsrate/Min./24 Std. Urin/Tier läßt sich der Prozentsatz an Glyoxylsäure, der in Oxalsäure übergegangen ist, errechnen.

2.6. Messung von markiertem ausgeatmetem CO₂

Sofort nach intraperitonealer Injektion von 1 μ C Glyoxyl-1-¹⁴C-säure wird das Tier in einen luftdicht abschließbaren Stoffwechselkäfig gebracht, der über einen Gummischlauch an ein CO₂ Exhalationsgerät angeschlossen ist. Die CO₂-Abgabe wird über einen Zeitraum von 2 Std. gemessen. Es folgt die Beschreibung des Meßplatzes, an dem die CO₂-Messung durchgeführt wurde.

Zu dem Meßplatz gehören:

1. ein Gasanalysator UNOR 2
2. ein Differenzzählrohr (Methandurchflußzähler)
3. ein Hochspannungserzeuger
4. ein Ratemeter
5. ein Integrator
6. ein Philips Schreiber .

Die Luft aus dem Stoffwechselkäfig wird von dem Unor, einem Infrarot-Absorptionsmeßgerät angesaugt.

In diesem Gerät erfolgt die Messung des CO₂-Gehaltes der ausgeatmeten Luft der Tiere. Zur Ermittlung der C¹⁴ Aktivität wird die ¹⁴CO₂haltige Luft weiter in einen Methandurchflußzähler geleitet. Die radioaktive Strahlung ionisiert das Gas im Zählrohr. Jeder durch ein eintreten des Teilchen hervorgerufene Ionisationsvorgang erzeugt unter der Wirkung der am Zählrohr liegenden Hochspannung einen elektrischen Impuls, der dem eingebauten Vorverstärker zugeführt wird. Die von dem Zählrohrvorverstärker

mit Schwellendiskriminator abgegebenen Impulse werden der im Hochspannungserzeuger eingebauten Differenz bzw. Antikoinzidenzstufe zugeführt. An den Ausgang dieser Stufe wird ein Ratemeter angeschlossen. Das Ratemeter dient zur Messung und linearen Anzeige von Impulsraten. Die durch das Ratemeter gemessene Impulsrate, die dem C^{14} -Gehalt der Atemluft entspricht, sowie der durch den Gasanalysator ermittelte prozentuale CO_2 -Gehalt werden von dem Integrator über die Zeiteinheit integriert.

Zur Registrierung der gemessenen Impulsrate und des CO_2 -Gehaltes pro Zeiteinheit sowie der beiden Integralwerte (Impulszahl entsprechend der ausgeatmeten Gesamtaktivität, CO_2 -Menge) wird ein 6-Farbenpunkt-drucker (Fa. Philips) verwendet. Ferner bildet und registriert der Drucker den Quotienten aus $\frac{\text{Impulsrate}}{CO_2\text{-Gehalt}}$.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Untersuchungen über den Glyoxylsäurestoffwechsel

3.1.1. Untersuchungen des Glyoxalatumsatzes im Rattenleberhomogenat ohne Belastung und nach intraperitonealer Injektion von Glycin und Glyoxalat

Glyoxalat war weder in der Leber von normalgefütterten Tieren, noch in der Leber von Thiaminfrei ernährten Tieren nachweisbar. Da ein Abbauweg des Glycins zu Glyoxalat verläuft (35), werden sowohl die Normaltiere als auch die Mangeltiere mit verschiedenen hohen Dosen an Glycin (0,13 bzw. 0,4 Mol/100 g Körpergewicht) belastet (intrapertoneale Injektion).

Trotz Belastung mit Glycin ließ sich keine Glyoxylsäure in der Leber nachweisen. Untersuchungen an Herz und Niere, die nach der beschriebenen Methode durchgeführt wurden, führten zu demselben Ergebnis. Ein unterschiedlicher Zeitintervall vom Spritzen bis zum Töten (5, 15, 30, 60, 90, 120 Min.) hatte ebenso keinen Einfluß auf das Untersuchungsergebnis. Bei einer Belastung mit Glyoxylsäure (intrapertoneale Injektion) konnte die Dosishöhe wegen der Toxizität der Glyoxylsäure nicht allzu hoch gewählt werden. Wird die Dosis von 1 mMol/Tier überschritten, so sterben die Tiere.

Eine unter dieser Dosis liegende Menge bewirkte kein Auftreten von Glyoxylsäure in der Leber, im Gehirn, in der Niere oder im Herzen. Ebenso wie bei der Glycinbelastung

ließ sich trotz unterschiedlicher Zeitintervalle vom Spritzen bis zum Töten keine Glyoxylsäure nachweisen. Die negativen Versuchsergebnisse lassen sich wahrscheinlich darauf zurückführen, daß die Glyoxylsäure, die auf Grund ihrer Struktur eine sehr reaktionsfähige Säure ist, im Stoffwechsel schnell umgesetzt wird, andere Verbindungen eingeht und so nicht mehr nachweisbar ist.

Möglicherweise wäre ein positiver Befund zu erwarten, wenn die Glyoxylsäure den Tieren in entsprechend hohen unphysiologischen Mengen verabreicht würde - dies ist jedoch wegen der Toxizität der Glyoxylsäure nicht möglich.

3.1.2. Untersuchungen des Glyoxalatumsatzes im Rattenleberhomogenat nach vorheriger Zugabe von Glyoxalat

Aus den Versuchsergebnissen (s. Tabelle 8) ist klar ersichtlich, daß bei einem Mangel an Thiamin und bei einer begrenzten Kalorienzufuhr die Leber im Vergleich zu den Kontrollen eine verminderte Fähigkeit zeigt, Glyoxalat abzubauen.

Tabelle 8: Glyoxalatumsatz im Rattenleberhomogenat

(Inkubation bei 37°C für 5, 10 und 15 Min., Glyoxalat in $\mu\text{M}/\text{mg}$ Leberprotein, Zahl der Beobachtungen in Klammern)

Versuchsgruppe	5'	Zeit 10'	15'
I Normaltiere	75,44 $\pm$ 2,58 (21)	88,72 $\pm$ 2,26 (21)	97,97 $\pm$ 1,86 (21)
II Thiamin- mangel	42,64 $\pm$ 1,88 (23)	56,88 $\pm$ 1,68 (23)	64,52 $\pm$ 1,92 (24)
III Protein- mangel	75,76 $\pm$ 2,16 (60)	93,77 $\pm$ 2,32 (60)	105,39 $\pm$ 2,26 (60)
IV Kalorien- mangel	57,32 $\pm$ 3,48 (38)	75,37 $\pm$ 4,56 (38)	86,34 $\pm$ 5,14 (38)

Kontrolltiere. Demnach scheint ein Abbau des Enzymproteins noch nicht stattgefunden zu haben. Wahrscheinlich werden im Proteinmangel erst die Muskelproteine zum Abbau bereitgestellt.

3.2. Untersuchungen über den Abbau von markiertem Glyoxalat zu CO₂

Messung von markiertem CO₂, nach Verabfolgung von ¹⁴C-Glyoxylsäure.

Tabelle 9: Prozent der verabfolgten Menge markierter Glyoxylsäure (1 µC/Tier), die in CO₂ übergeht/Tier/2 Std.

	Impulse/Min	% des gesamt verabfolgten ¹⁴ C	Anzahl der Tiere
I. Normaltiere	614,1 ± 64	0,09	8
II. B ₁ -Mangel	535,3 ± 48	0,08	8
III. B ₆ -Mangel	189,9 ± 33,2	0,03	8
IV. B ₁ +B ₆ -Mangel	371,3 ± 23,6	0,06	8

Gesamtimpulse der Dosis bei einer Ansprechwahrscheinlichkeit von 30 % = 666 666 Imp/Min.

Die Signifikanz zwischen den Gruppen wurde nach dem t-Test berechnet. Die Unterschiede waren zwischen allen Gruppen mit Ausnahme der Gruppen I und II signifikant.

Die Messung wurde nach der Injektion über einen Zeitraum von 2 Stunden durchgeführt, da, wie sich aus Vorversuchen

ergab, nach dieser Zeit kein radioaktives CO_2 mehr ausgeatmet wurde.

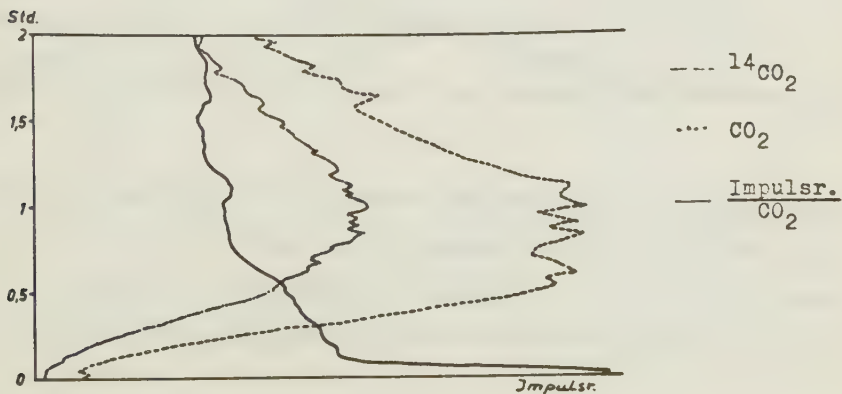
Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß maximal 0,1 % des injizierten Glyoxalats in Form von markiertem CO_2 wieder abgegeben werden. Dieser Höchstwert gilt für die Kontrollgruppe.

Ein Thiaminmangel führt zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung der CO_2 -Abgabe aus Glyoxalat. Dagegen ist ein kombinierter Thiamin- und Pyridoxinmangel die CO_2 -Ausscheidung um etwa 40 % herabgesetzt.

Im Falle eines Pyridoxinmangels ist die CO_2 -Abgabe noch stärker beeinträchtigt, so daß im Vergleich zu den Kontrolltieren nur noch 1/4 der gemessenen markierten CO_2 -Menge nachweisbar ist.

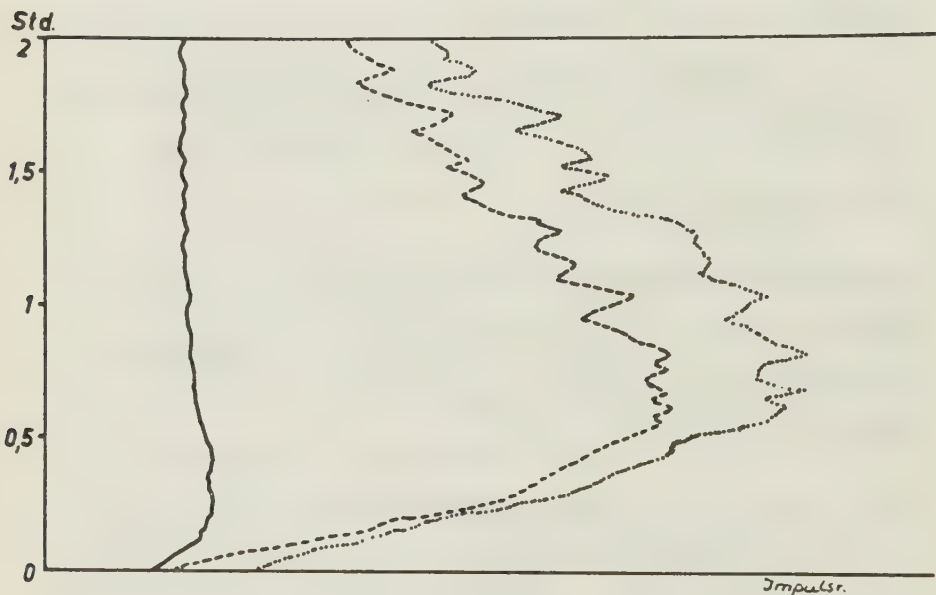
Folgende Kurven zeigen den typischen Verlauf der $^{14}\text{CO}_2$ -Abgabe von Normaltieren und von Tieren, die entweder Thiaminfrei oder Thiamin- und Pyridoxinfrei ernährt wurden.

Abb. 5: $^{14}\text{CO}_2$ -Abgabe - Normaltier



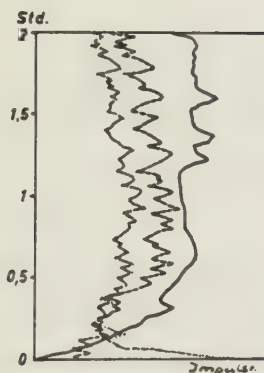
Aus dem Kurvenverlauf ist ersichtlich, daß nach Injektion von Glyoxyl-1- ^{14}C -säure (Zeitpunkt 0) in kurzer Zeit viel $^{14}\text{CO}_2$ ausgeatmet wird. Die $^{14}\text{CO}_2$ -Abgabe ist am intensivsten zwischen 35 und 60 Min. Während dieser Zeit bleibt sie fast konstant. Danach kommt es zu einem schnellen Abfall der markierten Substanz in der ausgeatmeten Luft.

Abb. 6: $^{14}\text{CO}_2$ -Abgabe - Thiaminmangeltier



Nach einem schnellen Anstieg erreicht die $^{14}\text{CO}_2$ -Abgabe innerhalb von 35 Min. ihren Höhepunkt. Im Vergleich zu den Normaltieren bleibt sie jedoch nur kurze Zeit auf dem gleichen Niveau und sinkt dann kontinuierlich wieder ab.

Abb. 7: $^{14}\text{CO}_2$ -Abgabe - Thiamin- und Pyridoxinmangeltiere



Auffallend an dieser Kurve ist, daß die geringe $^{14}\text{CO}_2$ -Menge, die innerhalb der 2 Std. abgeatmet wird, während einer relativ langen Zeit konstant bleibt (35 bis 100 Min.) und keinen eindeutigen Höhepunkt erreicht.

Vergleicht man die drei Kurven miteinander, so geht deutlich daraus hervor, daß die $^{14}\text{CO}_2$ -Abgabe bei den Normaltieren am höchsten ist, von einem Thiaminmangel kaum beeinflusst wird und bei einem kombinierten Thiamin- und Pyridoxinmangel stark abnimmt.

3.3. Untersuchung über die Oxalsäureausscheidung

3.3.1. Oxalsäurekonzentration im Urin bei Thiamin-, Pyridoxin- und Thiamin- und Pyridoxinmangel

Den Mangeltieren wurden Kontrolltiere gegenübergestellt, die ein vollwertiges halbsynthetisches Futter erhielten, da das sonst verwendete Zuchtfutter, Altromin - wie sich aus Vorversuchen ergab, Bestandteile enthält, die die Oxalatausscheidung erhöhen.

(S. Seite 42).

Jede Versuchsgruppe bestand aus 12 Tieren. Tabelle 9 zeigt diese Ergebnisse.

Tabelle 9: Oxalatausscheidung im Urin (mg/24 Std/Tier) bei Kontroll-, Thiamin-, Pyridoxin, Thiamin- und Pyridoxinmangeltieren.
Zahl der Analysen in Klammern.

	Normaltiere	B ₁ -Mangel	B ₆ -Mangel	B ₁ +B ₆ -Mangel
Altromin	0,27±0,09(49)			
Halbsynt. Futter	0,17±0,04(16)	0,15±0,03(49)	0,64±0,23(31)	0,55±0,20(31)

Es zeigt sich, daß es bei einem Thiaminmangel zu keiner erhöhten Oxalatausscheidung im Urin kommt. Ein Pyridoxinmangel jedoch läßt die Oxalatausscheidung um das 4-fache gegenüber den Kontrolltieren ansteigen. Ähnliche Beobachtungen machten Gershoff und Faragalla (19). Sie erhielten jedoch etwas geringere Werte für den Anstieg der Oxalatausscheidung im Pyridoxinmangel.

Bei einem kombinierten Thiamin-Pyridoxinmangel wird nicht

mehr Oxalsäure als bei einem isolierten Pyridoxinmangel ausgeschieden - daraus ergibt sich, daß der Thiaminmangel keinen Einfluß auf die Oxalatausscheidung hat.

3.3.2. Oxalsäurekonzentration bei Thiaminmangel nach Belastung mit Äthylenglykol, Oxalsäure, Glyoxylsäure, Glycin und Tryptophan

Es wurde versucht, durch Belastung mit Verbindungen, welche Vorstufen des Oxalats bzw. des Glyoxalats darstellen, die Stoffwechsellage zu beeinflussen. Die Tiere erhielten die Zusatzstoffe nach vorheriger Neutralisation mit dem Trinkwasser verabreicht. Jede Versuchsgruppe bestand aus 12 Tieren.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zusammengestellt.

Tabelle 10: Oxalatausscheidung im Urin mg/24 Std./Tier/100 ml
aufgenommener Flüssigkeitsmenge.
Zahl der Analysen in Klammern

	Normal	B ₁ -Mangel
Altromin	0,27±0,09 (49)	
Halbsynth.Futter	0,17±0,04 (16)	0,15±0,03 (49)
<u>Belastung</u>		
Glykol (1 %)	2,39±1,4 (27)	0,77±0,03 (40)
Oxalsäure (1 %)	1,74±1,3 (13)	1,42±0,09 (30)
Glyoxylsäure (1 %)	1,75±1,3 (49)	1,69±1,16 (34)
Glycin (3%)	0,16±0,01 (48)	0,16±0,01 (39)
Tryptophan (0,25%)	0,59±0,02 (50)	0,70±0,05 (31)

Sämtliche Zusatzstoffe mit Ausnahme des Glycins ließen sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den Thiaminmangeltieren die Oxalatausscheidung ansteigen.

Bei den Normaltieren war der Anstieg am höchsten nach Belastung mit Äthylenglykol. Diese Tiere wiesen häufig wie durch eigene Vorversuche bestätigt werden konnte, Ca-oxalatkristalle in der Niere auf. Die Steinbildung steht offenbar in engem Zusammenhang mit der hohen endogenen Oxalatsynthese.

Nach oraler Zufuhr von Oxalat stieg zwar die Oxalatausscheidung auf das 10-fache an, von der aufgenommenen Menge wurden jedoch nur 0,2 % im Urin wiedergefunden.

Entweder ist nur die Menge Oxalat ausgeschieden worden, die auch resorbiert wurde, oder ein Teil der resorbierten Menge hat sich als Ca-Oxalat in bestimmten Organen abgelagert und konnte daher im Urin nicht mehr nachgewiesen werden.

In eigenen Vorversuchen ließen sich vereinzelt kleine Ca-Oxalatkristalle in der Niere feststellen.

Ein Abbau oder Umbau der Oxalsäure kann im Organismus nicht stattgefunden haben, da die Oxalsäure metabolisch inert ist.

Erstaunlich ist, daß nach Belastung mit Glycin die endogene Oxalatsynthese nicht ansteigt.

Theoretisch müßte dies der Fall sein, wenn Glyoxalat ein Zwischenprodukt im Glycinstoffwechsel ist.

Eine Erklärung für dieses Versuchsergebnis können vielleicht die von Nakada und Weinhouse in vitro durchgeführten Versuche geben (38).

Sie beobachteten, daß nach Zugabe von markiertem Glyoxalat, Glykolat und Glycin zu Rattenleberschnitten Glyoxalat und Glykolat in Oxalsäure übergangen, während Glycin nicht zur Oxalatsynthese beitrug.

Eine über Glyoxalat verlaufende Umsetzung zu Oxalat trat nur ein, wenn Glycin-2-¹⁴C zum Rattenleberhomogenat, in dem ein unmarkierter Glyoxalatpool nachweisbar war, hinzugegeben wurde.

Glyoxalat scheint also nur in Oxalat überzugehen, wenn es in unphysiologisch hohen Konzentrationen vorliegt, wird es aber als Stoffwechselprodukt in geringer Konzentration gebildet, so findet der Abbau auf einem anderen Wege statt.

Dieser Abbauweg ist, wie sich in weiteren Versuchen von Nakada und Weinhouse zeigte, (38) die Oxidation zu CO_2 . Sie gaben zum Leberhomogenat verschieden hohe Dosen an Glyoxalat und stellten fest, daß mit steigender Konzentration der Abbau zur Oxalsäure zunahm, während die CO_2 -Bildung weniger wurde.

Steigt nach Gaben von Glycin die Oxalatsynthese nicht an, so spricht dies nicht dagegen, daß Glyoxalat ein Zwischenprodukt bei der Glycinoxidation ist.

Wahrscheinlich ist die vorhandene Glyoxalatkonzentration nur nicht hoch genug, um in Oxalat überzugehen.

Zwischen den Kontroll- und Thiaminmangeltieren machten sich nur Unterschiede in der Oxalatausscheidung nach Verabreichung von Äthylenglykol bemerkbar. Die Ausscheidung war 3 mal so hoch als bei den Mangeltieren.

Aus Versuchsergebnissen geht hervor, daß Thiaminmangel keinen Einfluß auf eine erhöhte Oxalatsynthese hat.

Ist der Abbauweg des Glyoxalats zu CO_2 und Formiat gehemmt, so wird das anfallende Glyoxalat nicht zu Oxalat oxidiert., sondern kann entweder auf anderem Wege abgebaut werden oder möglicherweise Verbindungen eingehen, die den Ablauf des Citronensäurecyclus hemmend beeinflussen.

3.3.3. Oxalsäurekonzentration bei Pyridoxin, Pyridoxin- und Thiaminmangel nach Belastung mit Äthylenglykol und Glycin

Der Versuch wurde unter den gleichen, wie im vorhergehenden Versuch angewandten Bedingungen, durchgeführt.

Tabelle 11: Oxalatausscheidung im Urin mg/24 Std/Tier/100 ml aufgenommener Flüssigkeitsmenge
(Zahl der Analysen in Klammern)

	Normal	B ₆ -Mangel	B ₁ +B ₆ -Mangel	B ₁ -Mangel
Altromin	0,27±0,09(49)			
halbsyn. Futter	0,17±0,04(16)	0,64±0,23(31)	0,55±0,20(31)	0,15±0,03(49)
<u>Belastung</u>				
Glykol (1 %)	2,39±1,4 (27)	1,99±0,12(31)	4,61±1,19(31)	0,77±0,03(40)
Glycin (1 %)	0,16±0,01(48)	0,97±0,50(31)	0,97 ±0,40(31)	0,16±0,01(39)

Während bei den Kontrolltieren eine Glycinbelastung keinen Einfluß auf die Oxalatausscheidung hat, kommt es im Pyridoxin und im kombinierten Pyridoxin- und Thiaminmangel zu einem Anstieg der Ausscheidung.

Der Anstieg ist bei beiden Gruppen gleich hoch, d.h. das Versuchsergebnis ist nur auf das fehlende Pyridoxin zurückzuführen.

Ob die erhöhte Oxalatausscheidung im Pyridoxinmangel ausschließlich auf eine verminderte enzymatische Transaminierung von Glyoxalat auf Glycin zurückzuführen ist, ist fraglich, da auch eine nichtenzymatische Transaminierung zwischen Glyoxalat und Glycin stattfinden kann.

Nach Verabreichung von Glykol ist die Oxalatausscheidung sowohl im Thiaminmangel als auch im Pyridoxinmangel niedriger als bei den Kontrollen. Im kombinierten Thiamin-Pyridoxinmangel jedoch steigt die Oxalatausscheidung im Vergleich zu dem Kontrollwert auf das doppelte, im Vergleich zum Ausgangswert auf das 8-fache an.

Während ein Thiaminmangel selbst nach Belastung mit bestimmten Verbindungen bisher keinen Einfluß auf die Oxalatausscheidung zeigte, scheint er sich in Kombination mit einem Pyridoxinmangel nach Belastung mit Glykol fördernd auf die endogene Oxalatsynthese auszuwirken.

Das Äthylenglykol wird wahrscheinlich bei Blockierung eines Stoffwechselweges (B_6 oder B_{12} -Mangel) nicht zur Oxalsäure sondern zu einem anderen Stoffwechselprodukt abgebaut. Im Falle eines kombinierten Mangels wird der Abbauweg zur Oxalsäure wieder in vermehrtem Maße in Anspruch genommen.

Die durch einen isolierten Vitaminmangel hervorgerufenen biochemischen Veränderungen müssen also nicht unbedingt durch einen kombinierten Mangel potenziert werden, sondern es können neue Veränderungsformen auftreten.

3.3.4. Oxalsäurekonzentration im Urin bei Thiamin-, Pyridoxin-, und Pyridoxin- und Thiaminmangel nach Belastung mit markierter Glyoxylsäure

Nach intraperitonealer Injektion von $1 \mu\text{C}$ -Glyoxyl- ^{14}C -säure pro Tier (160 g Körpergewicht) wurde in den ersten Tagen der 24 Std.-Urin untersucht.

Jede Gruppe bestand aus 8 Tieren. Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse aus dieser Versuchsreihe.

Tabelle 12: Prozent der verabfolgten Menge markierter Glyoxylsäure ($1 \mu\text{C}$ /Tier) die in Oxalsäure übergeht /Tier/24 Std.

	Impulse/Min.	1. Tag	2. Tag	3. Tag
I. Normaltiere	138,826 $\pm$ 58000	(11,9 %	0,53 %	0,20 %
II. B ₁ -Mangel	67,741 $\pm$ 49000	5,9 %	1,0 %	0,29 %
III. B ₆ -Mangel	135,594 $\pm$ 31000	11,6 %	0,59 %	0,31 %
IV. B ₁ +B ₆ -Mangel	225,562 $\pm$ 64000	19,3 %	0,61 %	0,67 %

Gesamtimpulse der Dosis bei einer Ansprechwahrscheinlichkeit von 52 % = 1.164.421 Imp/Min.

Die Signifikanz zwischen den Gruppen wurde nach dem t-Test berechnet.

I:II→ $p < 0,05$ I:III→ N.S I:IV→ $p < 0,05$ II:III→ N.S

II:IV→ $p < 0,01$ III:IV→ $p < 0,02$

N.S: Nichtsignifikant

Es werden maximal 19,3 % des injizierten Glyoxalats als Oxalat wiedergefunden. Dieser Höchstwert wird im kombinierten Thiamin-+ Pyridoxinmangel erreicht.

Ein Thiaminmangel führt zu einer Beeinträchtigung des Einbaues von markiertem ^{14}C der Glyoxylsäure in Oxalsäure.

Im Thiaminmangel ist der Einbau im Vergleich zum kombinierten Mangel um 70 %, im Vergleich zu dem Kontrollwert um 50 % herabgesetzt.

Keinen Einfluß auf den Einbau von markiertem ^{14}C in Oxalsäure hat der Pyridoxinmangel. Es geht gleich viel markierte Glyoxylsäure in Oxalsäure über wie bei der Kontrollgruppe.

Dieses Versuchsergebnis muß nicht unbedingt im Widerspruch dazu stehen, daß die beim Pyridoxinmangel beobachtete Oxalurie auf einen vermehrten Abbau von Glyoxalat zu Oxalat zurückzuführen ist, denn die injizierte Glyoxylsäure kann im Stoffwechselgeschehen unterschiedlich von der aus anderen Vorstufen als Zwischenprodukt gebildeten Glyoxylsäure umgesetzt werden.

Die Oxalatausscheidung im Zusammenhang mit Mangelzuständen von Vitaminen stellt ein sehr komplexes Geschehen dar,

wobei höchstwahrscheinlich ein kombinierter Mangel an mehreren B-Vitaminen die für eine vermehrte Oxalatausscheidung günstigste Stoffwechselsituation schafft.

Im kombinierten Pyridoxin-+ Thiaminmangel treten im Vergleich zu den Normaltieren, Thiaminmangel- und Pyridoxinmangelgruppen die höchsten Werte nach Belastung mit Äthylenglykol und Glyoxylsäure auf. Im Falle eines kombinierten Mangels ohne Belastung oder nach Belastung mit Glycin ist kein Unterschied zu denen im Pyridoxinmangel erhaltenen Werte vorhanden.

Würde es bei einer Polyavitaminose zu einer "Addition" der einzelnen Symptome kommen, so wäre nach Belastung mit Glyoxylsäure die erhöhte Oxalatausscheidung im Thiamin- + Pyridoxinmangel unerklärlich, da im Thiaminmangel die Oxalatausscheidung erniedrigt ist und im Pyridoxinmangel die Ausscheidung nicht vom Kontrollwert abweicht. Das Zusammenwirken mehrerer Faktoren (Thiaminmangel; Pyridoxinmangel; Zusatzstoff) auf das Stoffwechselgeschehen kann also zu einem neuen Erscheinungsbild führen.

4. Zusammenfassung

Literaturstudien führten zu der Überlegung, daß der Einfluß von exogenem Oxalat auf die Oxalatausscheidung im Urin, sowie auf die Urolithiasis ohne Bedeutung ist und daß man sich bei der Aufklärung des in vielen Ländern vorkommenden Steinleidens mehr den Untersuchungen der Reaktionsabläufe im Oxalatstoffwechsel widmen sollte.

Das bedeutet natürlich nicht, daß der Nahrungsfaktor ausgeschlossen werden soll, vielmehr spielt wahrscheinlich die Zusammensetzung der Nahrung, das Fehlen oder Auftreten bestimmter Nahrungsbestandteile eine bedeutende Rolle.

Wichtige Schritte der Oxalatbiosynthese im Organismus hängen von der Versorgung mit Thiamin und Pyridoxin ab. Deshalb wurde zunächst geprüft, ob sich ein isolierter oder kombinierter Mangel an diesen Vitaminen auf die Ausscheidung von Oxalat im Urin auswirkt.

Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, daß ein Thiaminmangel keinen Einfluß auf die endogene Oxalatsynthese hat. Selbst nach Belastung mit verschiedenen Stoffen, von denen man annimmt, daß sie im Organismus in Oxalsäure übergehen, machten sich keine Unterschiede in der Oxalatausscheidung zwischen Normal- und Thiaminmangelratten bemerkbar.

Im Gegensatz zum Thiaminmangel wirkte sich ein Pyridoxin-

mangel fördernd auf die endogene Oxalatsynthese aus. Orale Glycingaben begünstigten diesen Effekt. Erstaunlicherweise ließ eine Belastung mit markierter Glyoxyl-1-¹⁴C-säure (intraperitoneale Injektion) die Oxalatausscheidung nicht ansteigen. Vermutlich wird die injizierte Glyoxylsäure auf anderem Wege als die im intermediären Stoffwechsel gebildete Glyoxylsäure abgebaut.

Die für die endogene Oxalatsynthese günstigste Stoffwechselsituation wird durch einen kombinierten Thiamin-Pyridoxinmangel geschaffen.

Die zu diesem Resultat führenden Versuche erstreckten sich auf titrimetrische Bestimmungen der Oxalsäure im Harn sowohl ohne Belastung als auch nach Belastung mit Vorstufen der Oxalsäure, sowie auf Messungen markierter Oxalsäure nach intraperitonealer Injektion von Glyoxyl-1-¹⁴C-säure.

Da dem Glyoxalat offensichtlich eine wichtige Stellung in der Biosynthese des Oxalats zukommt, wurde das Verhalten dieser Verbindung unter verschiedenen Fütterungsbedingungen bei der Ratte geprüft. (Thiamin-, Protein- und Kalorienmangel)

Die Untersuchungen wurden im Leberhomogenat ausgeführt. Hierbei stellte sich heraus, daß der Glyoxalatumsatz im Thiaminmangel vermindert ist.

Eine eindeutige Aussage über die Thiaminversorgungslage

eines Tieres aufgrund der Bestimmung des Glyoxalatum-satzes ist jedoch nicht möglich, da auch ungenügende Kalorienverwertung als Ursache für den Abfall der Enzymaktivität in Frage kommt. Eine Abnahme des ausgeatmeten CO_2 konnte im Thiaminmangel nicht festgestellt werden.

Die im Thiaminmangel vermehrt auftretende Glyoxylsäure wird, wie die titrimetrischen und radiochemischen Untersuchungen gezeigt haben, nicht zu Oxalsäure oxidiert, sondern scheint auf anderem Stoffwechselweg umgesetzt zu werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die endogene Oxalatbildung ein komplexer Vorgang ist, der auch von dem Versorgungszustand des Organismus mit Thiamin und Pyridoxin abhängig ist.

Die Untersuchungen sind von praktischer Bedeutung, da ein gestörter Glyoxalat- bzw. Oxalatstoffwechsel in engem Zusammenhang mit dem Auftreten von Blasen- und Nierensteinen steht.

Sowohl in den Entwicklungsländern (Vietnam, Thailand, Indien usw.), also in Ländern mit ungenügender Versorgung an Kalorien, Protein, Thiamin, Riboflavin und Pyridoxin, als auch in den westlichen Industriestaaten, ist das Problem der Oxalurie mit nachfolgender Steinbildung von Interesse.

5. Literaturverzeichnis

- 1 Abbott, L.D.; Lewis, H.B.: Comparative studies of the metabolism of the amino acids. IX Glycine precursors. Availability of N-ethylglycine and glycolic acid for the synthesis of hippuric acid in the rabbit. J. Biol.Chem. 137, 535, (1941)
- 2 Andersen, D.A.: The nutritional significance of primary bladder stones. Brit. J. Urol. 34, 160, (1962)
- 3 Archer, H.E.; Dormer, A.E.; Scowen, E.F.; Watts, R.W.E.: Studies on the urinary excretion of oxalate by normal subjects. Clin. Sci. 16, 405 (1957)
- 4 Archer, H.E.; Dormer, A.E.; Scowen, E.F.; Watts, R.W.E.: The aetiology of primary hyperoxalurie. Brit. Med. J. 1, 175 (1958)
- 5 Atkins, G.L.; Dean, B.M.; Griffin, W.J.; Scowen, E.F.; Watts, R.W.E.: Primary hyperoxalurie: The relation between ascorbic acid and the increased urinary excretion of oxalate. Lancet ii, 1096 (1963)
- 6 Beisenherz, G.; Boltze, H.J.; Bücher, Th.; Czok, R.; Garbade, K.H.; Meyer-Arendt, E.; Pfeleiderer, G.: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycero-phosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Zschr. Naturforsch. 8 b, 555 (1953)

- 7 Bergmayer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie, GmbH, Weinheim, Bergstr. (1962)
S. 300
- 8 Buckle, R.M.: The glyoxylic acid content of human
blood and its relationship to thiamine deficiency.
Clin. Sci. 25, 207 (1963)
- 9 Cawhall, J.C.; Watts, R.W.E.: The metabolism of glyoxylate
by human and rat liver mitochondria. Biochem. J.
85, 163, (1962)
- 10 Elder, T.D.; Wyngaarden, J.B.: The biosynthesis and
turnover of oxalate in normal and hyperoxaluric
subjects. J. Clin. Invest. 39, 1337 (1960)
- 11 Faber, S.R.; Feitler, W.W.; Bleiler, R.E.; Ohlson, MA.
Hodges, R.E.: The effect of an induced pyridoxine
and pantothenic acid deficiency on excretions of
oxalic and xanthurenic acids in the urine. Amer.
J. Clin. Nut. 12, 406 (1963)
- 12 Faragalla, F.F.; Gershoff, S.N.: Occurrence of C¹⁴-
oxalate in rat urine after administration of
C¹⁴-tryptophan. Proc.Soc. Exper. Biol. Med. 114,
602, (1963).

- 13 Fleisch, H.; Bisaz, S: The inhibitory effect of pyrophosphat on calcium oxalate precipitation and its relation to urolithiasis. *Experientia* 15, 276, (1964)
- 14 Fleming, L.W.; Crosbie, G.W.: Non-enzymatic transamination between glycine and glyoxalate. *Biochim.bio-physica acta.* 43, 139 (1960)
- 15 Frederick, E.W.; Rabkin, M.T.; Ritchie, R.H. Jr.; Smith, L.H.Jr.: Studies on primary hyperoxalurie. I. In vivo demonstration of a defect in Glyoxylate metabolism. *N. England J. Med.* 269, 821 (1963)
- 16 Gershoff, S.N.: Vitamin B₆ and oxalate metabolism. *Vitamins and Horm.* 22, 581, (1964)
- 17 Gershoff, S.N.; Andrus, S.B.: Dietary magnesium, calcium and vitamin B₆ and experimental nephropathies in rats: Calcium oxalate calculi, apatite nephrocalcinosis. *J. Nutrit.* 73, 308, (1961)
- 18 Gershoff, S.N.; Andrus, S.B.: Effect of vitamin B₆ and magnesium on renal deposition of calcium oxalate induced by ethylene glycol administration. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 109, 99 (1962)

- 19 Gershoff, S.N.; Faragalla, F.F.: Endogenous oxalate synthesis and glycine, serine, deoxypyridoxine-interrelationships in Vitamin B₆-deficiency rats. J. Biol.Chem. 234, 2391 (1959)
- 20 Gershoff, S.N.; Faragalla, F.F."Nelson, D.A.; Andrus, S.B.: Vitamin B₆-deficiency and oxalate nephrocalcinosis in the cat. Amer.J. Med. 27, 72, (1959)
- 21 Gershoff, S.N.; Prie, E.L.: Excretion of urinary metabolites in calcium oxalate urolithiasis. Effect of tryptophan and Vitamin B₆ administration. Amer.J. Clin. Nut. 8, 812 (1960)
- 22 Gershoff, S.N.; Prie, E.L.: Effect of daily MgO and Vitamin B₆ administration to patients with recurring calcium oxalate kidney stones. Amer. J. Clin. Nut. 20, 393 (1967)
- 23 Gershoff, S.N.; Prien, E.L.; Chandrapanond, A.: Urinary stones in Thailand. J. Urol. 90, 285 (1963)
- 24 Gibbs, D.A.; Watts, R.W.E.: An investigation of the possible role of xanthine oxidase in the oxidation of glyoxylate to oxalate. Clin. Sci. 31, 285, (1966)

- 25 Griffith, W.H.: Effect of glucosamine and glycolic acid on detoxication of sodium benzoate in rats. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 28, 216 (1930)
- 26 Hockaday, T.D.R.; Clayton, J.E.; Frederick, E.W.; Smith, L.H. Primary hyperoxalurie, Medecine, 43, 315, (1964)
- 27 Hockaday, T.D.R.; Clayton, J.E.; Smith, L.H.: The metabolic error in primary hyperoxalurie. Arch. Dis. Childh. 40, 485, (1965)
- 28 International Union of Biochemistry: Report of the enzymes of the International union of biochemistry. Symposium series. Volume 20. Pergamon Press. Oxford. London, New York. Paris 1961
- 29 Koch, K.: Oxalsäurebestimmung im Urin bei Reihenversuchen. Biochem. Zschr. 203, 422 (1936)
- 30 Lang, K.: Biochemie der Ernährung. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, 2. Auflage, Darmstadt 1970 S. 627
- 31 Liang, C.C.: Studies on experimental thiamine deficiency trends of keto acid formation and detection of glyoxylic acid. Biochem. J. 82, 429 (1962)
- 32 Ludwig, G.D.: Renal calculi associated with hyperoxalurie. Ann. N.Y. Acad. Sc. 104, 621, (1963)

- 33 Mengel, K.: Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze.
V.E.B. Gustav Fischer Verlag, 2. Auflage, Jena
1965, S. 100
- 34 Moulin, F.: La lithiase urinaire au centre vietnam.
Med.trop. 26, 273 (1966)
- 35 Nakada, H.I.; Friedmann, B.; Weinhouse, S.: Pathways
of glycine catabolism in rat liver. J. Biol.
Chem. 216, 583, (1955)
- 36 Nakada, H.I.; Sund, L.P.: Glyoxylic acid oxidation by
rat liver. J. Biol. Chem. 233, 8 (1958)
- 37 Nakada, H.I.; Weinhouse, S.: Non-enzymatic transamination
with glyoxylic acid and various amino acids.
J. Biol. Chem. 204, 831, (1953)
- 38 Nakada, H.I.; Weinhouse, S.: Studies of glycine oxidation
in rat tissues. Arch. Biochem. 42, 257, (1953)
39. Neims, A.H.; Hellermann, L.: Specificity of the D-
amino oxidase in relation to glycine oxidase
activity. J. Biol. Chem. 237, 976 (1962)
- 40 Mordin, E.E.C.; Robertson, W.G.: Calcium phosphate and
oxalate inon-products in normal and stone forming
urines. Brit. Med. J. 1, 450, (1966)

- 41 Nutr.Rev.: Thiamine deficiency and glyoxylic acid formation in rats. Vol. 22, No. 1, 23 (1964)
- 42 Peters, R.A.: Pyruvic acid-oxidation in brain. 1. Vit. B₁ and the pyruvate oxidase in pigeons brain. Biochem. J. 30, 2206, (1936)
- 43 Rapoport, S.M.: Medizinische Biochemie. Volk und Gesundheit, 5. Auflage, Berlin 1969 S. 911
- 44 Ratner, S.; Nocito, V.; Green, D.E.: Glycine oxidase. J. Biol. Chem. 119, 152, (1944)
- 45 Ruffo, A.; Adinolfi, A.; Budillon, G.; Capobianco, G.: Control of the citric acid cycle by glyoxylate
2. Mechanism of the inhibition of respiration in liver and kidney particles. Biochem. J. 85, 592, (1962)
- 46 Ruffo, A.; Testa, E.; Adinolfi, A.; Pelizza, G.: Control of the citric acid cycle by glyoxylate.
1. A new inhibitor of aconitase formed by the condensation of glyoxylate with oxalacetate. Biochem. J. 85, 588 (1962)
- 47 Runyan, T.J.; Gershoff, S.N.: The effect of vitamin B₆ deficiency in rats on the metabolism of oxalic acid precursors. J. Biol. Chem. 240, 1889, (1965)

- 48 Runyan, T.J.; Gershoff, S.N.: Glycine metabolism in vitamin B₆-deficient and deoxypyridoxine treated rats. J. Nutrit. 98, 113, (1969)
- 49 Sengbusch, R.; Sücker, I.: Bestimmung der Oxalsäure im Urin und die Beeinflussung seines Oxalatgehalts durch exogene und endogene Faktoren. Zschr. klin.Chem. 1,3, (1966)
- 50 Swenseid, M.E.; Villalobos, J.; Driedrich, B.: Free amino acids in plasma and tissue of rats fed a vitamin B₆-deficient diet. J. Nutrit. 82, 206, (1964)
- 51 Takenouchi, K.; Aso, K.; Kawase, K.; Ichikawa, H.; Shiomi, T.: On the metabolites of ascorbic acid, especially oxalic acid, eliminated in urine, following the administration of large amounts of large amounts of ascorbic acid. J. of vitaminology, 12, 49 (1966)
- 52 Tanret, P.; Thomas, J.; Cottenot, F.: Evolution des depots oxaliques et lipidiques au cours de la lithiase renale experimentale par l'ethylene-Glykol et l'acide oxalique. Compt. rend. Soc. biol. 155, 1, 1025 (1961)

- 53 Thompson, J.S.; Richardson, K.E.: Isolation and characterization of a glutamate-glycine transaminase from human liver. Arch.Biochem.Biophys. 117, 599 (1966)
- 54 Weinhouse, S.; Friedmann, R.: Metabolism of labeled 2-carbon acids in the intact rat. J. Biol. Chem. 191, 707, (1951)
- 55 Williams, H.E.; Wilson, M.; Smith, L.H.: Studies on primary hyperoxaluria. III. Transamination reactions of glyoxylate in human tissue preparations. J. Laborat. Clin.Med. 70, 494 (1967)
- 56 Zarembski, P.M.; Hodgkinson, A.: The oxalic acid content of English diets. Brit. J. Nutr. 16, 627, (1962)
- 57 Zelitch, I.: Oxidation and reduction of glycolic and glyoxylic acids in plants. II. Glyoxylic acid reductase. J. Biol. Chem. 201, 719, (1953)

Herrn Prof. Dr. Cremer möchte ich für die Überlassung
des Themas und des Arbeitsplatzes herzlich danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv. doz. Dr.
W. Felgheim für die ständige Betreuung und Anleitung
bei allen Arbeiten.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Sattler, der es mir ermög-
licht hat, im Strahlencentrum zu arbeiten.

Lebenslauf

Am 30. Dezember 1943 wurde ich als viertes von fünf Kindern in Eutin als Tochter des Arztes Dr. med. Claus Walter Hauschildt und der Ärztin Dr. med. Johanna Hauschildt geb. Voigt, geboren.

In Wattenbek besuchte ich von 1950 bis 1954 die Grundschule. 1954 kam ich nach Kiel auf ein Neusprachliches und Mathematisch-Naturwissenschaftliches Gymnasium, wo ich nach neunjähriger Schulzeit die Reifeprüfung bestand.

Während meiner einjährigen Praktikantinnenzeit (1963 - 1964) nahm ich an einem halbjährigen Abiturientinnenlehrgang an der Städtischen Bildungsanstalt für Frauenberufe Kiel teil.

Vom 1. November 1963 bis 15. Januar 1964 war ich in der Diätküche der Klinik Prof. Dr. med. Zabel, Berchtesgaden, tätig und arbeitete dann anschließend in der Privatklinik Bircher Benner, Zürich.

Am 1. Mai 1964 begann ich das Studium der Hauswirtschafts- und Ernährungswissenschaften in Giessen und erhielt dort 1968 das Diplom.

Die Untersuchungen für meine Dissertation nahm ich im September 1968 am Institut für Ernährungswissenschaften I Giessen auf.

